
VERGLEICH VERSCHIEDENER FIBRINOGENBESTIMMUNGEN
IN DER KLINISCHEN ROUTINEDIAGNOSTIK

vorgelegt von

Hans-Albrecht Görnitz

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554425_0032

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof. Dr. H. P. Wolff

VERGLEICH VERSCHIEDENER FIBRINOGENBESTIMMUNGEN
IN DER KLINISCHEN ROUTINEDIAGNOSTIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen
Medizinischen Fakultät der Johannes
Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Hans-Albrecht Görnitz
aus Thondorf

Mainz 1972

Dekan:

Professor Dr. K.H. Bäßler

Referent:

Professor Dr. W.G.A. Ohler

Korreferent:

Professor Dr. H.P. Wolff

Tag der mündlichen Prüfung:

11. Januar 1973



Gesamtherstellung:

DITTERS BÜRODIENST

Heidesheim b. Mainz
Ruf (06132 / 5711)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
Bedeutung der Fibrinogenbestimmung In der klinischen Diagnostik	1
Übersicht der Fibrinogen- bestimmungsmethoden	2
Aufgabenstellung der Arbeit	15
II. METHODEN	16
1. Patientengut	16
2. Blutentnahme und Zentrifugation	16
3. Hitze-Fibrinogen-Bestimmung nach Schulz	18
4. Kjeldahlometrische Bestimmung des Fibrinogens	20
5. Photometrische Bestimmungen des Fibrinogens	24
6. Modifizierte Biuret-Methode	45
7. Statistische Auswertungsmethoden	47
III. ERGEBNISSE	49
1. Zuverlässigkeit der Methoden	49
2. Vergleich der Methoden	55
IV. DISKUSSION	64
V. ZUSAMMENFASSUNG	70
LITERATURVERZEICHNIS	71

1. EINLEITUNG

Die quantitative Bestimmung des Fibrinogens im Plasma ist ein wertvolles Hilfsmittel für die Diagnose und Prognose zahlreicher Krankheiten. Schnelle, grobe Bestimmungsmethoden werden verwendet zur Diagnose einer akuten Hypofibrinogenämie in der Chirurgie und vor allem in der Geburtshilfe bei vorzeitiger Placentallösung, Eindringen von Amnionflüssigkeit in den mütterlichen Kreislauf, Eklampsie, Retentio placentae und intrauterinem Tod. In diesen Notfällen entscheidet eine Fibrinogen-Schnellbestimmung zum Teil über Therapie und Behandlungskontrolle, wie zum Beispiel als Hinweis auf den Erfolg einer Heparintherapie bei der Verbrauchskoagulopathie bzw. auf die Notwendigkeit einer Substitutionstherapie mit Fibrinogen und mit COHN-Fraktion-1.

Zeitlich aufwendigere, genauere Fibrinogenbestimmungsverfahren, wie sie innerhalb eines Gerinnungsstatus durchgeführt werden, haben vielleicht für die Diagnose einer Koagulopathie geringere Bedeutung als andere Blutgerinnungsbestimmungen, da sowohl relativ niedrige als auch hohe Fibrinogenwerte allein relativ wenig Einfluß auf die Blutgerinnungsvorgänge haben (119). Dennoch ist die Feststellung einer Hypo-, Eu- und Hyperfibrinogenämie eine notwendige Zusatzaussage. Die seltene kongenitale Afibrinogenämie und die erworbene hochgradige Hypofibrinogenämie mit gesteigerter Fibrinolyse sind hingegen die Hauptaussage einer Fibrinogenbestimmung bei einer Gerinnungsanalyse (90).

Wichtig sind auch genaue Fibrinogenbestimmungen zur Feststellung pathologischer Fibrinogenwerte, die oft parallel zur BSG verlaufen. Hohe Fibrinogenwerte geben einen Hinweis auf entzündliche Prozesse - in akuter wie auch chronischer Phase - und, von wenigen Ausnahmen abgesehen, auf bösartige Tumore. Ein Abfall der sehr hohen und mittelhohen Fibrinogenwerte, z. B. bei Nephrosen, Myokardinfarkt, Lobärpneumonie, Bronchial-Ca, Lymphogranulomatose, Cholecystitis und Polyarthritits erlaubt den Schluß auf Therapieerfolg oder Spontanremission dieser Erkrankungen. Niedrige Fibrinogenwerte hingegen werden bei Erkrankungen der Leber, insbesondere bei chronischer Hepatitis oder einer Leberzirrhose gefunden. S c h u l z (119) hat in diesem Zusammenhang auch auf die differentialdiagnostische Bedeutung der Fibrinogenbestimmung, besonders bei akuter Leukämie, Lymphogranulomatose, Lebererkrankungen und Bronchial-Ca hingewiesen. Dabei wurde die letztgenannte Erkrankung in bezug auf ihre Früherkennung und ihre Abgrenzung gegen andere Lungenerkrankungen besonders hervorgehoben.

Schließlich sind exakte Fibrinogenbestimmungen für wissenschaftliche Arbeiten notwendig, die vor allem der Abgrenzung der Normalwertbereiche dienen und damit eine Festlegung treffen, wann von pathologischen Fibrinogenwerten gesprochen werden kann.

Die Wahl der Bestimmungsmethode ist demnach abhängig vom Anwendungsbereich, der Zeitaufwand und Genauigkeit der Methode festlegt, und außerdem vom technischen Aufwand. Die Vielzahl der Bestimmungsmethoden und deren Modifikationen machen deutlich, daß eine Methode mit einem Optimum an Genauigkeit, einem Minimum an Zeit und einem geringen technischen Bedarf noch nicht gefunden worden ist.

Die Zugehörigkeit des Fibrinogens zu den Plasmaproteinen führte zu ähnlichen Untersuchungsmethoden wie bei den übrigen Bluteiweißkörpern, solange die quantitative Bestimmung des Eiweißes (physikalisch, chemisch und immunologisch) im Vordergrund stand. Diese Methoden haben sich ganz zwangsläufig aus den Trennungsv Verfahren der Plasmaproteine entwickelt. Die gerinnungsphysiologische Komponente des Fibrinogens, die neben der Salzausfällung seine Umwandlung aus der löslichen Form in die unlösliche Form seines Polymerisationsproduktes Fibrin ermöglichte, unterschied die Fibrinogenbestimmungsmethoden von denen der übrigen Plasmaeiweiße. So konnte auch die Zeit, die zur Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin benötigt wurde, als Maß zur Fibrinogenbestimmung zugrundegelegt werden (23, 96).

Methoden, die ohne Isolation und Darstellung des Fibrinogens als Fibrin bzw. Fibrinogenpräzipitat auszukommen versuchten, waren problematisch und mit Schwierigkeiten verbunden (70, 94, 95, 116, 124, 131). So war lediglich die Möglichkeit gegeben, die Ausgangsbedingungen zur Fibrinogendarstellung zu verbessern. Die Wahl der Gerinnungshemmung vor der Bestimmung und die Isolierung zur Bestimmung mit den Problemen der Mitfällung bzw. dem Einschluß anderer Stoffe ließen je nach Stand der Wissenschaft neuere Methoden mit moderneren Antikoagulantien und direkter enzymatischer Umwandlung des Fibrinogens entstehen, deren Zahl über 80 betragen soll (33).

Die folgende Übersicht, die kurz auf das Prinzip der wichtigsten Methoden eingeht, berücksichtigt nicht die Löslichkeitskurven, die Ultrazentrifuge, die COHN-Fraktionierung und die Versuche mit dem Thromboelastographen. Diese sind für den klinischen Betrieb nicht bzw. noch nicht brauchbar.

ÜBERSICHT ÜBER DIE QUANTITATIVEN FIBRINOGEN-BESTIMMUNGSMETHODEN

Methode	Prinzip	Beschreiber
1. GRAVIMETRISCH		
a. Gewichtsbestimmung des Fibrinogenpräzipitates	Aussalzung durch halbgesättigte NaCl-Lösung, Abfiltrierung vom Plasma, Trocknung bei 100°C	Hammarsten (52) - 1879
	Aussalzung durch viertelgesättigtes $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	Reye (105) - 1898
b. Gewichtsbestimmung des Fibringerinnsels	Recalcifikation des Citratplasmas, Verhinderung von Salzausfällungen, Fibringerinnsel gewaschen mit Aqua dest., 10%ige NaCl-Lösung, Alkohol und Alkoholäther zur Entfernung anderer Proteine und Lipide. Trocknung bei 100°C.	Gram (48) - 1921
	modif.: Normalwerte 350 - 550 mg%	Bezançon et al. (13) - 1926
	modif.: Waschung des Gerinnsels bis abtropfende Flüssigkeit eine negative Sulfosalicylsäureprobe ergibt.	Starlinger (124) - 1923
	modif.: Gerinnungsreagens enthält Äthylalkohol.	Ingram (62) - 1952
	modif.: Ersatz der Recalcifikation durch Thrombin	Morrison (85) - 1947 Bang (8) - 1957 Audiffren (7) - 1960
	modif.: Verwendung von Thrombin und Gerinnselgewinnung durch Abzentrifugation	Fearnley (34) - 1951

Methode	Prinzip	Beschreiber
	modif.: Thrombinlösung mit Alkohol. Mikromethode	Wycoff (134) - 1956
	Korrektur mit "Verdünnungsfaktor"	Wycoff (135) - 1960
	modif.: Zugabe von Protamin bei Plasma von Leberkranken	Gadboys et al. (39) - 1960
	modif.: Zugabe von EACA bei Fibrinolyse	Nilsson u. Olsson (88) - 1962
	Recalcifikation des Oxalat- plasmas, Bildung unlösli- cher Kalksalze und Ausfällung des unlösli. Calcium-Fibrin- salzes. Fibringewichtsbe- stimmung wie bei Gram.	Foster und Whipple (37) - 1922
	modif.: Zur Vermeidung der Kalksalz- ausfällung Blutsammlung in gekühlten Reagenzgläsern	Sassler (114) - 1937

11. VOLUMETRISCH	Differenz zwischen Gesamt- N-Bestimmung des Oxalat- plasmas und einer gleichen Menge Serum	Pfeiffer-Kossler (95) - 1896
	Stickstoffgehalt des Fibrins oder Differenz zwischen Gesamt-N des Plasmas und dem Serum bzw. dem Filtrat des Fibrinogenpräzipitates.	
a. Kjeldahlom- metrie des Fibrin- gerinnsels oder -präcip.	Fibringerinnsel aus recal- cifiziertem Oxalatplasma mit H ₂ SO ₄ und CuSO ₄ -Lösung (Katalysator) verascht. Nach Zugabe von NaOH im Kjeldahl-App. destilliert und mit H ₂ SO ₄ neutrali- siert. Überschuß titriert. Umr.faktor für N-Gehalt: 6,15	Cullen und van Slyke (24) - 1920

Methode	Prinzip	Beschreiber
	modif.: Zugabe von Thromboplastin und Ca^{++} zum Oxalatplasma	Jones und Smith (66) - 1930
	modif.: Mikromethode mit 0,1 - 0,2 ml Citratplasma. Ver- aschung mit Phosphormolyb- dän-Schwefelsäure. Über- schuß von Hypobromit, der nicht durch Ammoniakstick- stoff verbraucht, jodo- metrisch mit Thiosulfat er- mittelt. Umr.faktor: 6,25	Rappaport und Gelger (101) - 1934
	modif.: Hohe Plasmaoxalatver- dünnung, Umr.faktor: 6,0	Schulz (119) - 1953
	modif.: Protamin-Zugabe mit Ca^{++} -Überschuß	Mylon et al. (87) - 1942
	modif.: Recalcifikation des Oxalat- plasmas in Anwesenheit von Thromboplastin	Richter (106) - 1957
	modif.: Kjeldahlometrie des Fibrinogenpräzipitates mit Essigsäure	Dubreuil (29) - 1939
b. Kjeldahl- Differenz- bestimmung	Recalcifikation verdünnten Oxalatplasmas mit Diffe- renzbestimmung von Gesamt-N des Plasmas und des Serums. Umr.faktor: 6,25	Howe (59) - 1921
	modif.: Fibrinogen mit 10,6%iger Na_2SO_4 ausgesalzen. Diffe- renz mit Filtrat.	Howe (60) - 1923
	modif.: ohne Oxalatplasma; Blut in paraffinierten und gekühl- ten Reagenzgläsern aufge- fangen.	Ronchet (109) - 1945

Methode	Prinzip	Beschreiber	
	modif.: Aussalzung des Fibrinogens mit 12%iger Na_2SO_3	Arany (3)	- 1944

III. COLORIMETRISCH

a. Biuret-Reaktion	Biuret-Reaktion in alkalischer Fibrinlösung (ausgefälltes oder geronnenes Fbg) bzw. Differenz zwischen Biuret-Eiweißbestimmung des Gesamtplasmas und dem Filtrat des präzipitierten Fibrinogens.		
	Fibringerinnselbildung mit Ca^{++} und Thrombin in Pufferlösung. Gerinnseauflösung in 3%iger NaOH	Ware et al. (129)	- 1947
	Na_2SO_3 -Ausfällung bzw. Hitzeausfällung des Fbg aus Oxalatplasma. Diff. zw. Eiweiß-Biuret-Bestimmung des Oxalatplasmas und des Filtrates des Präcipitates.	Andry (3, 4)	- 1949 - 1960
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Aussalzung des Fbg aus Oxalatplasma. Präcipitat mit NaOH in Anwesenh. von CuSO_4 hydrolysiert. Nach Biuret-Reagens-Zugabe mit Pulfrich-Photometer (Filter S 53; 530 m μ) gemessen. Normalmittelwert: 2,9 g/l.	Marenzi und Gomez (78)	- 1951
	Gerinnselbildung durch CaCl_2 ; hydrolysiert mit 1 n NaOH; gemessen bei 490 m μ mit Beckman-Quartzspectrophotometer. Biuret-Reagens nach Weichselbaum.	Esser und Heinzler (32)	- 1952
	Mikromethode unter Verwendung von Biuret-Reagens nach Reinhold/Friedmann und von Phenol-Biuret-Reagens nach Lowry	Reiner und Cheung (104)	- 1959

Methoden	Prinzip	Beschreiber	
	Ausfällung durch Hitze bei 56° C, Na ₂ SO ₃ und Thrombin + CaCl ₂ . Auflösung des Gerinnsels mit 5%iger Na ₃ PO ₄ . 12H ₂ O, 2,5%ige NaOH, Verw. von Phenol-Biuret-Reagens und Benedict's-Reagens, gem. bei 540, 560, 320 m/μ.	Goodwin (42) (43) (44)	- 1961 - 1965 - 1967
b. Tyrosin-Reaktion:	Colorimetrischer Nachweis des Tyrosins (Tryptophans) in alkalischer, hydrolys. Fbg.-Lösung mit dem Reagens nach Folin-Wu bzw. dem n. Folin-Ciocalteu	Wu (133) Folin und Ciocalteu (36)	- 1922 - 1927
	modif.: Gerinnung durch Recalcifikation in 10%iger NaOH durch Kochen gelöst und Reaktion mit dem Folin-Wu-Reagens unter blau-grüner Farbentwicklung. Farbin-tensität entspricht Tyrosingehalt. Umr. mit Tyr.-äquivalent-Faktor auf Fbg.	Quick (99) Kautzsch und Rauscher (68)	- 1942 - 1950
	modif.: Verwendung von Citrat-plasma und Thrombin. Ablesung bei 650 m/μ; Normal-mittelwert: m: 272 mg%; w: 294 mg%	Ratnoff und Menzie (103)	- 1951
	modif.: Gerinnungsgewinnung mit EACA	Perkins und Rofls (92)	- 1963
	modif.: Messung bei 710 m/μ und neuer Umr.faktor bei entsprechendem pH	Astrup et al. (5)	- 1964

Methode	Prinzip	Beschreiber
c. Ninhydrin-Reaktion	Colorimetrischer Nachweis der Aminosäuren mit Ninhydrin in alkalischer, hydrol. Fbg.-Lösung. Gerinnungsgewinnung aus Plasma mit Phosphat-Puffer, NaCl-Lösung und Thrombin-Lösung, Hydrolyse in NaOH-NaCl-Lösung. Zugabe von NaCl-Lösung und Ninhydrin-Reagens, Messung bei 570 m/μ; Berechnung anhand einer Eichkurve.	Salfer und Newhouse (113) - 1954
d. Nessler-Reaktion	Colorimetrischer Stickstoffnachweis mit Nessler-Reagens in saurer Lösung nach Veraschung des Fibrins.	Koch und McMeekin (71) - 1924
	Ausfällung des Fibrinogens mit Na ₂ SO ₃ ; Veraschung mit einer Mischung von Schwefel- und Phosphorsäure. Zugabe v. Nessler-Reagens, Messung mit Spektralphotometer bei 460 m/μ; mit Filterphotometer bei 420 m/μ. Umr.faktor über N-Gehalt des Fbg: 6,0	Campbell und Hanna (19) - 1937
	Fibringewinnung mit CaCl ₂ , Veraschung mit Schwefelsäure unter Zusatz v. SeO ₂	DeJory (25) - 1949
	Mikromethode (0,1 ml Plasma), Umr.faktor: 6,25	Wycoff (134) - 1956

IV. TURBIDIMETRISCH

Nephelometrische Konzentrationsbestimmung der optischen Dichte, die durch Ausfällung und Gerinnung von Fbg oder Auflösung von Fibrin durch Harnstofflösung entsteht.

Methode	Prinzip	Beschreiber	
a. Trübungs- messung des Fbg-präcip.	Fbg-ausfällung mit Kochsalzlösung mit einem bestimmten pH. Messung mit Zeiss'schem Nephelometer.	Gerok (40)	- 1952
	Ausfällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Parfentjev et al. (91)	- 1953
	Messung mit Coleman-Nephelometer bei 470 m/ μ	Fowell (38)	- 1955
		Rafferty et al. (100)	- 1958
	Perfektion der Technik durch Ausfällung, Lösung und erneute Ausfällung mit einem Kation-Detergens.	Jacox (65)	- 1954
	Fbg-Niederschlag mit Na_2SO_4	Podmore (97)	- 1959
	modif.: Ablesung am Meunier-Elektrophotometer	Vincent et al. (128)	- 1962
b. Trübungs- messung des Fibrin- gerinnsels	Ausfällung mit 1,20 M Phosphatpuffer	Martinek und Berry (80)	- 1965
	Fbg-Hitzedenaturierung über 15 min. bei 56° C. Trübung bei 650 m/ μ mit Spektralphotometer gem.	Stirland (126)	- 1956
	Messung der Trübung, die durch Recalcifikation oder Thrombinzugabe zu Oxalat- oder Citratplasma entsteht. Anfangs: Zur Erfassung des Gerinnungsablaufes, Fbg-konzentration abhängig von der endgültig erreichten max. Dichte nach entspr. Gerinnungszeit		
	Recalcifikation von Citratplasma	Ebbecke und Knüchel (30)	- 1939

Methode	Prinzip	Beschreiber
	Recalcifikation von Oxalatplasma. Beeinflussung der Turbidität durch Präzipitation von Ca-Oxalat	Nygaard (89) - 1940
	Recalcifikation von Citratplasmaverdünnung	Meunier und Dreyfuss (83) - 1940
	Zugabe von Thromboplastin und CaCl_2 zum Citratplasma	Losner (76) - 1951
	Coagulation des Oxalatplasmas mit Thrombin zur Vermeidung des Einflusses der Recalcifikation auf die Turbidität.	Calman und Cole (18) - 1960
	Vereinfachung dieser Technik	Ingram und Matchett (63) - 1960
	Coagulation des Citratplasmas mit Calcium-Thrombin-Lösung; stabileres Fibrin.	Ellis und Stransky (31) - 1961
	Thrombinlösung mit Calciumlactatlösung.	Ilca et al. (61) - 1963
c. Trübungsmessung des wieder gelösten Fibrins	Bestimmung der optischen Dichte des im Harnstoff gelösten Fibrins	
	Coagulation von EDTA-Plasma mit Puffer- und Thrombin-Lösung. Ausgewaschene Fibrinflocke mit 40%iger Harnstofflösung gelöst. Messung der optischen Dichte bei 320 - 360 m μ .	Jacobsson (64) - 1955 Nilsson und Olow (88) - 1962
	Recalcifikation von 0,5 oder 0,2 ml Citratplasma, Auflösung des Gerinnsels durch Trypsin; Messung bei 280 m μ .	Christensen (21) - 1955

Methode	Prinzip	Beschreiber
---------	---------	-------------

V. ELEKTROPHORETISCH

Bestimmung der Fraktion $\emptyset$
durch Messung des Unterschiedes vom Eiweißspektrum
im Plasma und Serum

freie Elektrophorese	Stenhagen (125) - 1938 Barbagallo-Sanglorgi und Caputo (9) - 1953
Papier-Elektrophorese	Antonini und Piva (2) - 1953 Berkes ^y et al. (12) - 1956 Hirsch und Cattaneo (56) - 1956 Antonaci et al. (1) - 1958

VI. REFRAKTOMETRISCH

Differenz-Refraktometrie, aber Brechungsfehler mit Oxalatplasma; deshalb um- ständliche Methode mit Natlvplasma.	Winternitz (131)- 1910 Starlinger (124)- 1923
--	--

VII. DIFFUSIOMETRISCH

Bestimmung des Tyndall- Effektes (im Gegensatz zur photometrischen Messung der optischen Dichte)	
Bestimmung des Unterschiedes der Lichtdiffusion durch Plasma und durch Serum nach Gerinnung.	Klinke und Ellas (33, 70) - 1913

VIII. VISKOSIMETRISCH

Mit Viskosimeter von Ost- wald wird die Viskosität eines Oxalatplasmas und eines Serums nach Koagu- lation gemessen. Unter- schied = Viskosität des Fibrinogens $\rightarrow$ Fbg-wert	Petersen (94) - 1953
--	----------------------

Methode	Prinzip	Beschreiber
IX. CHRONOMETRISCH		
	Schnellmethoden, die auf Thrombinzeit und Thromboplastinzeit (Quick-Test) basieren.	
a. Thrombinzeitmessung	Voraussetzung: niedrige Fibrinogenkonzentration (1:21 verdünntes Plasma) und hochkonzentrierte Thrombinlösung (Antithrombinausschaltung, so daß die Zeit in erster Linie vom Fbg-gehalt abhängig ist).	
	Beziehung zwischen Thrombinzeit und dem Fbg-wert bei Werten bis 500 mg%. Bei höheren Werten Verdünnung des Plasmas notwendig.	Pinniger und Prunty (96) - 1946 Shinowara und Rosenfeld (122) - 1951 Scott (121) - 1955 Bonsnes und Sweeney (14) - 1955
	Citrat- oder Oxalatplasma mit Michaelis-Puffer 1:9 verdünnt, Thrombinzeitbestimmung von 0,2 ml Plasma verdünnung. Fbg-wert aus einer Eichkurve. Normalwerte: 10-17 sec. entspr. 200-500 mg%. Bestimmung möglich bei Fbg-werten zw. 100-1000 mg%. Unter 100 mg% niedrigere Plasma verdünnung notwendig.	Clauss (23) - 1957
	modif.: Angabe eines Nomogramms zur Auswertung von Fbgzeitbestimmung aus verschiedenen Verdünnungsstufen.	Haupt et al. (53) - 1959
	modif.: Trasylolzusatz	Marx (81) - 1964
	FPT-Test (Fibrin Polymerization Time) unter Verwendung eines Antifibrinolytikums.	Vermlyen et al. (127) - 1963

Methoden	Prinzip	Beschreiber	
b. Quick-Zeit-messung	Voraussetzung: Prothrombinfreies Plasma	Adams (33)	- 1960

X. KOAGULATIONSTITER

Aufstellung einer Vollblut- oder Plasma verdünnungsreihe und Feststellung der Verdünnung, bei der noch Spongierung eintritt.

a. mit Gesamtblut:	Koagulation der Blutverdünnungsreihe mit Thrombin; höchste Verdünnung, bei der ein Gerinnsel zu erkennen ist, ist der Fbg-titer. Fbg-normalwerte bei Verdünnung 1:400.	Schneider (116)	- 1952
--------------------	--	-----------------	--------

b. mit Plasma:	Oxalatplasma-Verdünnungsreihe	Gräf und Kimbell (47)	- 1956
		Rosenberg (110)	- 1956
	Citratplasma-Verdünnungsreihe	Bowman und Yellito (15)	- 1957

XI. HITZEFIBRIN	Hitzedenaturierung des Fbg bei 56° C. Messung des abzentrifugierten Hitzefibrin-niederschlags im Nisselröhrchen; Fbg-wert durch Kjeldahl-Vergleich.	Schulz (120)	- 1955
-----------------	---	--------------	--------

XII. IMMUNOLOGISCH

Fibrinogenbestimmung mit Antifibrinogen serum

a. photometrisch	Antiserum von Antikörper-titer mit Testserum → AG-AK-Reaktion → Trübung (bei 450 mμ abgelesen). Möglichkeit des Nachweises nicht gerinnbarer Derivate des Fbg in Plasma und Serum.	Schultze und Schwick (118)	- 1959
		Gross et al. (49)	- 1963

Methode	Prinzip	Beschreiber
b. Immuno- elektro- phoretisch	Mikromethode	Scheidegger (115) - 1955 Clarke (22) - 1966
c. passiver Hämagglu- tinations- hemmungs- test	ermöglicht bei Aflbrino- genämie einen Fibrinogen- nachweis von 1,2 mg%	Gugler et al. (50) - 1964
d. FI-Test ⁺	Latexpartikel, mit Anti- fibrinogenserum beladen, ergeben eine sichtbare Präzipitation bei Fibrin- nogenkonzentration über 100 mg% oder bei hoher Konzentration von Fibrin- spaltprodukten.	Lasch und Heene (72) - 1968 Holzknecht (58) - 1970

XIII. RADIOAKTIV

Gereinigtes, mit 131 markiertes Fibrinogen wird zu einer bestimmten Plasmamenge gegeben. Die Plasma-Fibrinogenkonzen- tration wird bestimmt durch Division der Radio- aktivität der Fibrinmenge und der spezifischen Radioaktivität des Fibrins.	Atencio et al. (6) - 1965
$(F = \frac{R_f}{S_f})$	
Normalmittelwert 3,72 mg/ml	

⁺ FI-Test. Los Angeles, Calif.: Hyland Laboratories 1964

Das gravimetrische Verfahren und die - oft nach der klassischen Methode von C u l l e n und v a n S i l y k e (24) modifizierte - volumetrische Kjeldahl-Bestimmungsmethode sind in der Literatur als am genauesten bezeichnet und bei Vergleichsbestimmungen als Standardmethoden verwendet worden (5, 10, 12, 31, 32, 40, 57, 85, 101, 116, 119, 124). In einigen Fällen wurde die Kjeldahl-Methode zur Erstellung der Eichkurve für eine neue Methode benutzt (21, 23, 30, 120). Die sich durch ihre große Genauigkeit auszeichnende Kjeldahl-Methode bedingt neben der erforderlichen langen Bestimmungsdauer einen großen Aufwand an Geräten, Reagenzien und Raum, was die Durchführung dieser Methode in kleinen Laboratorien schon immer erschwert hat. In modernen Kliniklaboratorien war sie aufgrund der Destillationsapparatur mit offenem Feuer und der Notwendigkeit eines großen Abzuges zur Veraschung für die Routinediagnostik umständlich. Ein weiterer Nachteil bei dieser Methode war die große Anzahl an Arbeitsschritten, die die Fehlermöglichkeiten erhöhen konnten.

Es war daher die Frage zu prüfen, ob andere Methoden mit der Genauigkeit der Kjeldahl-Methode konkurrieren und an ihre Stelle treten könnten. Von den photometrischen Methoden wurden bereits einige colorimetrische und turbidimetrische der Kjeldahl-Methode gegenübergestellt und brachten gute Ergebnisse (31, 32, 57). Die moderneren turbidimetrischen Methoden haben den Vorteil, das Plasma direkt - und nicht mehr an einem Spezial-Nephelometer, sondern an einem einfachen Photometer - unabhängig von dem Gerinnungsablauf (48) zu messen (31, 61). Es gibt jedoch noch immer Kritiker, die die Genauigkeit des in letzter Zeit häufiger verwendeten Verfahrens - insbesondere bei hämolytischem, icterischem und lipämischem Plasma - nicht so hoch einschätzen wie die des colorimetrischen Verfahrens (42, 43, 45).

Die von dem isolierten Fibrinogen ausgehenden und deshalb zeitraubenden colorimetrischen Methoden haben sich während der langen Erprobung bei der Serum-Eiweiß-Messung bewährt und sind durch ihre konstante Farbentwicklung weniger anfällig als die verwendeten Pufferlösungen bei den turbidimetrischen Messungen. Den Ausschlag zur Verwendung des colorimetrischen Verfahrens gab schließlich die Möglichkeit, von einer ähnlichen Fibrinogenisolierung wie bei der Kjeldahl-Bestimmung auszugehen, so daß sich diese Verfahren nur in der Eiweißbestimmungsmethode unterscheiden. Es war zu prüfen, welches Verfahren der hier gewählten colorimetrischen Fibrinogenbestimmungsmethode zum Vergleich mit der Kjeldahl-Methode in Frage kam.

Weiter war ein Vergleich der schnellen Hitzefibrinogen-Methode nach S c h u l z (120) mit dem Kjeldahl-Verfahren anzustellen und ihre Tauglichkeit in der Routinediagnostik zu untersuchen.

11. METHODEN

1. Patientengut

Die folgenden vergleichenden Fibrinogenbestimmungen wurden im Gerinnungslabor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz an einem Patientenkollektiv durchgeführt, das sich vorwiegend aus ambulanten und zum geringeren Teil aus stationären Patienten einer hauptsächlich hämatologischen Abteilung zusammensetzt. So sind die später in den Tabellen I, II und III aufgeführten Diagnosen ein echter Querschnitt durch das Patientengut einer hämatologischen Einheit: 30 Normalpersonen aus der Ambulanz mit Fibrinogenwerten innerhalb normaler Grenzen, 38 Patienten mit relativ seltenen hämatologischen Erkrankungen und schließlich 39 Patienten mit Lymphogranulomatose. Gerade bei dem Krankheitsbild der letztgenannten Patienten - sowohl bei den stationären mit akutem Krankheitsbild, als auch bei den ambulanten, in der Remission befindlichen - bedarf der Fibrinogenwert nicht nur in bezug auf die Bestimmungsmethode sondern auch auf die Krankheit einiger Worte am Schluß der Arbeit. Bei den vergleichenden Fibrinogenbestimmungsmethoden sollen diese Krankheitsbilder mit ihren zu erwartenden Werten über bzw. unter den Normalgrenzen helfen, die verschiedenen Methoden in allen Bereichen auszuleuchten und ihre Zuverlässigkeit zu prüfen.

2. Blutentnahme und Zentrifugation

Die Technik der Entnahme und der darauffolgenden Zentrifugation des Blutes war bei allen drei Bestimmungsmethoden identisch. Erst die weitere Verarbeitung der Proben wurde methodenspezifisch.

- Blutentnahme:

Die Blutentnahme erfolgte morgens in etwa zur gleichen Zeit. Nach Anlegen eines Stauschlauches beim Patienten wurden aus der Cubitalvene 4,5 ml Blut entnommen (nur geringer Unterschied des Fibrinogengehaltes in arteriellem und venösem Blut (119)). Dazu wurde eine 5 ml Spritze aufgezogen, die 0,5 ml 3,8%ige Natriumcitratlösung enthielt, um das Blut ungerinnbar zu machen.

Die Wahl des Citrates als Antikoagulans hat sich ergeben, da es üblicherweise verwendet wird und sich beim Vergleich mit Oxalat- und Fluoridplasma sowie mit Heparin und einem Salz von EDTA (Ethylene-Diamino-Tetraacetic-Acid) kaum ein Unterschied zeigte (10, 16, 42, 43, 80).

EDTA soll die meisten chemischen Analysen nicht stören; allerdings kann beim späteren Zentrifugieren ein beträchtlicher Fehler entstehen, worauf noch verwiesen wird (73).

Nach jeder Blutentnahme mußte die Spritze leicht mehrmals gekloppt werden, um eine gute Durchmischung des Nativblutes mit dem 10%anteiligen Natriumzitrat zu erreichen.

Zur Vermeidung von innerhalb jeder Vergleichsreihe möglichen Fehlern - individuell verschiedene Blutentnahmetechnik, ungenaues Mischungsverhältnis durch ungenügende Blutentnahme bzw. zu hohe oder zu niedrige Menge von Natriumzitrat - wurden mit dem einmal gewonnenen 5 ml Blut-Natriumzitratgemisch zwei verschiedene Fibrinogenbestimmungsmethoden durchgeführt. Damit wurden auch die Fehlerquellen ausgeschlossen, die bei zeitlich unterschiedlicher Blutentnahme beim Gesunden zwar geringe, beim Kranken jedoch beträchtliche Abweichungen des Fibrinogenwertes ausmachen können. Dieser Vorteil brachte allerdings den Nachteil einer Probenknappheit mit sich, wodurch bei der Vergleichsbestimmung zwischen der Kjeldahl- und Hitzefibrinogen-Methode die Möglichkeit einer Wiederholungsmessung nicht gegeben war.

- Zentrifugation:

Das Blut-Natriumzitratgemisch wurde langsam, unter Vermeidung von Schaumbildung, in ein Reagenzröhrchen gegeben und 5 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert, um das Plasma von den korpuskulären Blutbestandteilen zu trennen. Dabei ist allerdings zu beachten, daß sich nach ungenügender Zentrifugation in dem makroskopisch zwar klar erscheinenden Plasma noch Thrombozyten befinden. Diese werden dann bei den meist benutzten Fibrinogenbestimmungsmethoden, bei denen durch Recalcifikation oder Zugabe von Thrombin Fibrinogen in Fibrin überführt wird, in das Gerinnsel eingeschlossen. Daraus resultiert natürlich ein höherer Fibrinogenwert.

Nach Untersuchungen von [Laurell] (73) sind die Fibrinogenwerte nur dann relativ unabhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit, wenn der Thrombozytenwert des Blutes unter der Norm liegt. Bei normaler Thrombozytenzahl ist jedoch eine hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit notwendig. Bei niedrigen Zentrifugationsgeschwindigkeiten (unter 1000 g; $g = 0,000117 \times r \times (U/min.)^2$) wurden um 10 % zu hohe Fibrinogenwerte bei Patienten mit normalen Thrombozytenzahlen gefunden. Folglich erhöht sich der Fehler bei Patien-

tenblut mit über der Norm liegenden Thrombozytenzahlen. Diese Untersuchungen wurden allerdings unter Anwendung von Na₂ EDTA als Antikoagulans durchgeführt, da diese Substanz die Thrombozyten im Blut gut konservieren soll. Dagegen dürfte bei der Verwendung von Natriumzitrat dieser Fehler sehr gering sein, so daß Untersuchungen in dieser Richtung nicht mehr notwendig waren.

Bei der hier verwendeten Zentrifuge errechnet sich bei 3000 U/min. eine Zentrifugationskraft von 1600 g.

Nach der Zentrifugation von 5 ml Blut war entsprechend des Hämatokrits mit ungefähr 2,7 ml Plasma zu rechnen, das vorsichtig abpipettiert wurde und nun zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stand. Da der zeitliche Ablauf bei den jeweils zwei zu vergleichenden Bestimmungsmethoden, auch durch Stehzeiten, unterschiedlich war, konnten sie nahezu zur gleichen Zeit durchgeführt werden. Damit wurden neben den bekannten Fehlerquellen, verursacht durch unterschiedliche Probenverwahrung, die mehr oder weniger starken fibrinolytischen Vorgänge ausgeschaltet, die durch verschieden lange Stehzeiten des Plasmas vor seiner weiteren Verarbeitung zu unterschiedlichen Fibrinogenwerten hätten führen können.

3. Hitze-Fibrinogen-Bestimmung nach Schulz

Mit der Beschreibung der Hitze-Fibrinogen-Methode nach S c h u l z (120) wird begonnen, da bei ihr die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Recalcifikation oder auf enzymatischer Grundlage entfällt und sie sich darin wesentlich von der Bestimmungsmethode nach Kjeldahl und Biuret unterscheidet.

- Prinzip:

Fibrinogen wird durch Hitze denaturiert und fällt aus. Nach anschließender Zentrifugation wird die als weißer Niederschlag sichtbare Fibrinogenmenge an einem graduieren Spezialgläschen abgelesen.

- Reagenzien und Geräte:

1. 3,8%ige Natriumcitratlösung
2. Nissel-Röhrchen (bis 3 ml graduert)
3. Zentrifuge

- Ausführung:

1. Nach der Blutentnahme und Zentrifugation des 5 ml Citratblutes wurde mit Hilfe einer 1 ml Vollpipette Citratplasma bis zum Teilstrich 1 ml in das Nissel-Röhrchen gegeben.

2. Das Nissel-Röhrchen wurde in ein Wasserbad von 56° C gebracht und maximal 10 min. darin belassen. Dabei bildete sich eine gallertartige Ausfällung.
3. Anschließend wurde das Nissel-Röhrchen mindestens 10 min. bei 2000 U/min. zentrifugiert.
4. Nach der Zentrifugation hatte sich in der Spitze des Röhrchens das ausgefällte Hitzefibrin als weißer Niederschlag abgesetzt, dessen Höhe an der Gradulierung des Röhrchens abgelesen werden konnte.

- Bestimmung des Fibrinogenwertes:

Ein Teilstrich auf dem Nissel-Röhrchen entspricht 0,01 ml. Durch Vergleich der Hitzefibrinwerte mit den kjeldahlometrischen fand Schulz (120) bei den Bestimmungen, die bis zum Teilstrich 0,07 ml gingen, einen durchschnittlichen Wert von ungefähr 70 mg%. Die Werte, die eine Hitzefibrinausfällung von 0,08 ml und darüber ergaben, entsprachen ungefähr 80 mg% kjeldahlometrisch bestimmtem Fibrin. Der Normal-Ausfällungsbereich des Hitzefibrins wurde mit 0,04 bis 0,07 ml angegeben.

Heute richtet man sich im allgemeinen nach der in der Literatur (67, 86) und in Laboranleitungen angegebenen Tabelle, nach der auch bei diesen Untersuchungen umgerechnet wurde. Lagen die Werte zwischen den Teilstrichen, wurde interpoliert.

<u>Hitzeibrin</u> <u>(Teilstrich=0,01 ml)</u>	<u>Fibrin-Äquivalent</u> <u>(mg% nach Kjeldahl)</u>
0,09	625
0,08	560
0,07	500
0,06	430
0,05	370
0,04	300
0,03	240
0,02	180
0,01	120

Nach der Hitze-Fibrinogen-Bestimmungsmethode wurden zuerst 40 Bestimmungen durchgeführt und mit den vom gleichen Plasma bestimmten Werten nach der Kjeldahl-Methode verglichen. Aus den anfangs schon erwähnten Gründen mußte man mit 5 ml Citratblut für den Vergleich auskommen.

Sowohl für die Hitze-Fibrinogen-Bestimmung als auch für die Bestimmung nach Kjeldahl wurden jeweils 1 ml Plasma benötigt, so daß die Plasmaausgangsmenge von ungefähr 2,7 ml für Doppelbestimmungen nicht ausreichte.

Es mag vielleicht paradox erscheinen, wenn die Hitze-Fibrin-Werte in mg%-Angaben, die auf einem Vergleich mit Kjeldahl-Messungen beruhen, noch einmal erneut mit der Kjeldahl-Methode verglichen werden. Es wäre bestimmt besser, bei dieser Methode die Teilstricheinheit anzugeben und bei Werten zwischen 0,04 bis 0,07 ml von normalen Werten, über bzw. unter diesem Bereich von erhöhten bzw. erniedrigten Fibrinogenwerten zu sprechen (26, 27). Da aber gerade in der Routinediagnostik genauere und damit vergleichbare und verständliche Werte in mg%-Angaben notwendig sind, erscheint ein Vergleich der Äquivalentwerte mit einem erneuten Kjeldahl-Vergleich sinnvoll. So können zum Beispiel bei der Beobachtung des Krankheitsverlaufes der Lymphogranulomatose 800 mg% als Anfangswert und 600 mg% als späterer Wert nach entsprechender Therapie oder beginnender Remission viel mehr aussagen, als wenn man auch beim letzteren Wert nur von einem erhöhten Fibrinogenwert spricht.

Im Anschluß an die 40 Einzelbestimmungsvergleiche zwischen der Hitzefibrinogen-Methode mit den Bestimmungen nach Kjeldahl wurde die Hitzefibrinogen-Methode mit der modifizierten Biuret-Methode verglichen. Dazu bestand zwar innerhalb der Aufgabenstellung keine Notwendigkeit, da ja durch den späteren Vergleich zwischen der Kjeldahl- und der Biuret-Methode indirekt auch eine Beziehung zur Hitzefibrinogen-Methode hergestellt wurde. Andererseits waren aber aufgrund der geringen notwendigen Plasmamenge für die Mikro-Biuret-Methode Doppelbestimmungen im Vergleich mit der Hitzefibrinogen-Methode und damit eine bessere Korrelation möglich. Für die Biuret-Methode waren 2 x 0,2 ml Plasma und für die Hitzefibrinogen-Methode 2 x 1,0 ml Plasma erforderlich. Dabei wurden 27 Doppelbestimmungen zwischen beiden Methoden für ausreichend erachtet.

4. Kjeldahlometrische Bestimmung des Fibrinogens

Die Kjeldahl-Methode beruht, ebenso wie die später beschriebene Biuret-Methode, auf der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin; sie wurde im Prinzip nach den klassischen Erstbeschreibern C u l l e n und v a n S l y k e (24) durchgeführt.

- Prinzip:

Citratplasma wird recalcifiziert. Das dadurch entstandene Fibringerinnsel wird isoliert, gewaschen und in einen Kjeldahl-Veraschungskolben überführt. Darin wird das Gerinnsel mit konzentrierter Schwefelsäure und Selenreaktionsgemisch als Katalysator gekocht. Der dabei frei werdende Stickstoff wird als Ammoniumsulfat gebunden. Ist der Kohlenstoff durch den Sauerstoff der Schwefelsäure vollkommen oxydiert (schwarze Lösung wird farblos), wird nach Erkalten mit Wasser verdünnt und im Überschuß Lauge zugegeben. Dabei wird Ammoniak aus dem Ammoniumsulfat freigesetzt und in einer Destillationsapparatur in eine bestimmte Menge Salzsäure als Vorlage überdestilliert. Anschließend wird die nicht neutralisierte Salzsäure mit Natronlauge zurücktitriert. So läßt sich aus dem Verbrauch der Salzsäure der Stickstoffgehalt des Fibrins und nach entsprechender Umrechnung die Fibrinmenge selbst bestimmen.

- Reagenzien und Geräte:

1. 3,8%ige Natriumcitratlösung
2. Gerinnungsreagens: CaCl_2 (H_2O frei) 0,85
 NaCl 4,25
 Aqua dest. ad 500 ml
3. Thrombinlösung* (3,2 N.I.H.-Einheiten/ml)
4. Epsilon-Aminocaprinsäure**
5. H_2SO_4 konz.
6. Selenreaktionsgemisch nach Wieninger***
7. 32%ige NaOH
8. Talkum
9. "Tashiro"-Indikator
10. n/100 HCl
11. n/100 NaOH
12. Kjeldahl-Veraschungskolben
13. Destillationsapparatur

- Ausführung:

1. Nach der Blutentnahme und Zentrifugation wurde mit einer 1 ml Vollpipette 1 ml Plasma unter Vermeidung von korpusculären Blutbeimengungen vorsichtig abpipettiert und in ein 50 ml Becherglas gegeben, das mit 30 ml Gerinnungsreagens gefüllt war. Der Inhalt des Becherglases wurde dann durch Umschwenken gemischt und bei 37°C in einem Brutschrank 1 h inkubiert.

+ Antithrombin-Reagens

Hersteller: Hoffmann-La Roche, Grenzach,
 bzw. ORHT (60 N.I.H.-Einheiten/ml) Test-Thrombin
 Hersteller: Behring-Werke AG, Marburg

++ Hersteller: Deutsche Kabl GmbH, München

+++ Hersteller: E. Merck AG, Darmstadt

Um die völlige Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin auch bei dem Plasma zu erreichen, das von Patienten mit stärkerer Verzögerung der Recalcifizierungszeit stammte (z. B. bei Hämophilen), wurden noch 0,05 ml Thrombinlösung zugegeben. Außerdem wurde dem Plasma, bei dem Verdacht auf verstärkte Fibrinolyse bestand, noch Epsilon-Aminocapronsäure hinzugefügt.

Die schon von C u l l e n und v a n S l y k e (24) verwendete Menge von 30 ml Gerinnungsreagens wurde von S c h u l z (119) für zu gering erachtet. Nach vergleichenden Untersuchungen arbeitete er anstelle der 30fachen Plasmaverdünnung mit der doppelten Menge, also mit 60 ml, und glaubte, damit einmal einen "Salzfehler", der durch die zugegebene Lösung von Natriumoxalat, Calciumchlorid und Natriumchlorid entstehen kann, und zum anderen einen "Eiweißfehler", der durch die im Fibringerinnsel hängenbleibenden Serumproteine entstehen kann, zu vermeiden.

Bei der hier ausgeführten Kjeldahl-Methode wurden dennoch weiterhin 30 ml Plasmaverdünnung verwendet, da die 60fache Verdünnungsflüssigkeit zu technischen Schwierigkeiten bei der unten beschriebenen Gerinnungsaufwicklung geführt hätte. Es erschien vorteilhafter, die Auswaschung des Gerinnsels zu verstärken, um damit die oben genannten Fehlerquellen möglichst klein zu halten.

Die von C u l l e n und v a n S l y k e (24) empfohlene Bebrütungszeit von 30 min. reicht bei den späteren Autoren (37, 48, 59, 101) von 1 h bis 2 h. S c h u l z (119) hat dann aufgrund der Untersuchungen über die Fibrinolyse von H a l s e (51) 60 min. für die Inkubation im Brutschrank für notwendig gehalten, damit einerseits die Gerinnung abgeschlossen ist und andererseits die erst danach einsetzende Fibrinolyse vermieden werden kann. Deshalb wurde auch hier 1 h inkubiert.

2. Danach wurde das gallertartige Gerinnsel vorsichtig mit Hilfe eines Glasstabes allseitig vom Becherrand gelöst und langsam durch Drehen des Glasstabes aufgewickelt. Durch gleichzeitiges Andrücken an die Becherwand wurde das Serum aus dem Gerinnsel ausgepresst, das schließlich als dünner Film den Glasstab umgab. Auf etwaige abgerissene Gerinnselreste, die sich von einer schwarzen Unterlage unter dem Becherglas gut abhoben, mußte bei abschließender Kontrolle geachtet werden. Dann wurde der dünne Fibrinfilm

dreimal gründlich mit Aqua dest. gewaschen, mit einem Papierfilter vom Glasstab abgerollt und in einen Kjeldahl-Veraschungskolben gegeben.

3. Zu dem Gerinnsel wurden 2 ml konzentrierte H_2SO_4 pipettiert, die Selenreaktionsgemisch enthielten, und dann 45 min. unter dem Abzug verascht.
4. War danach der Kolbeninhalt klar und farblos, wurde nach dessen Abkühlung Aqua dest., 10 ml 32%ige NaOH und eine Messerspitze Talkum unter Schütteln des Kolbens hinzugegeben, so daß er bis zur Hälfte gefüllt war. Der Kolben wurde dann an die Destillationsapparatur angeschlossen und in einen Erlenmeyerkolben destilliert, in den 5 ml n/100 HCl mit Vollpipette pipettiert waren unter Zugabe von zwei Tropfen Tashiro-Indikator. Nach Kochen des Kolbeninhaltes wurde 5 min. destilliert und 3 min. nachdestilliert.
5. Anschließend wurde die unverbrauchte HCl mit n/100 NaOH mit einer automatischen Bürette zurücktitriert. Der Tashiro-Indikator schlägt in seinen Farben folgendermaßen um:

pH 5,2	—————→	pH 5,6
weinrot	(fast farblos)	grün

- Berechnung des Fibrinogenwertes:

Nach Multiplikation des Titrationswertes mit dem Atomgewicht des Stickstoffes ergibt sich die Menge des Stickstoffes des untersuchten Fibringerinnsels. Um nun mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors auf das Gewicht des Fibrins bzw. des Fibrinogens zu schließen, muß der Stickstoffgehalt des Fibrins bekannt sein. In der Literatur schwanken die Angaben über den Stickstoffanteil des Fibrins zwischen 16,6 und 17,2 % (17), wobei noch nicht geklärt ist, ob sich der N-Gehalt des Fibrins bei Kranken und Gesunden unterscheidet. S c h u l z (119) hat in einer Untersuchung den durchschnittlichen prozentualen Stickstoffgehalt des Fibrins von Kranken und Gesunden bestimmt und den früheren Umrechnungsfaktor von 6,25 auf 6,0 (N-Gehalt von 16,8 % : $100/16,8 = 6,0$) festgelegt, der auch für diese Bestimmung hier zugrundegelegt wurde. So wurde nach Berechnung der Stickstoffmenge dieser Wert mit 6 multipliziert. Da aber die 5 ml Blut nach der Blutentnahme 10 % Natriumcitratlösung enthielten, mußten 10 % des

vorläufigen Fibrinwertes hinzugezählt werden, um schließlich den tatsächlichen Fibrinogenendwert in mg/100 ml zu bekommen.

Zusammenfassung der Berechnung:

Nach Eichung der Reagenzien und Geräte
ohne Fibringerinnung

NaOH Äquivalent (gegen 5 ml n/100 HCl +
dest. Reagenzien ohne Fibrin)

- verbrauchte NaOH bei der Titration
= Ergebnis
x 14 (Atomgewicht von Stickstoff)
= Stickstoffgehalt
x 6
= vorläufiger Fibrinogenwert
+ 10 % des vorläufigen Fibrinogenwertes
= Fibrinogenwert in mg%
=====

Mit dieser Methode wurden 40 Einzelbestimmungen im Vergleich gegenüber der Hitze-Fibrinogen-Methode und 40 Doppelbestimmungen im Vergleich gegenüber der nun folgenden Biuret-Methode durchgeführt.

5. Photometrische Bestimmungen des Fibrinogens

Es galt, unter den colorimetrischen Methoden eine Bestimmung zu finden, die eine große Genauigkeit besaß, sich den technischen Möglichkeiten des zur Verfügung stehenden Labors anpassen ließ und möglichst schnell und einfach durchgeführt werden konnte.

In der Literatur sind innerhalb der zahlreich angegebenen colorimetrischen Methoden vier Grundreaktionen zu erkennen:

1. Biuret-Reaktion
2. Tyrosin-Reaktion
3. Nessler-Reaktion
4. Ninhydrin-Reaktion

Nach dem Kriterium der Genauigkeit kamen von diesen vier colorimetrischen Standardmethoden die Biuret- und Ninhydrin-Reaktion in die engere Wahl. Diese beiden Methoden wurden von H i r s c h und C a t t a n e o (57) in vergleichenden Untersuchungen hinsichtlich ihrer Genauigkeit, auf Kjeldahl-Werte be-

zogen, als am geeignetsten bezeichnet. Bei der Entscheidung zwischen beiden Methoden mußten nun Zeit und Unkompliziertheit den Ausschlag geben. Zur Farbentwicklung benötigten sowohl die Ninhydrin-Reaktion (113) als auch die Biuret-Reaktion (130) 30 min. Dazu kamen bei der Ninhydrin-Reaktion weitere 30 min. für die Hydrolyse - im Gegensatz zu 10 min. bei der Biuret-Reaktion -, wodurch sich für diese ein geringerer Zeitaufwand ergab. Außerdem mußte das Ninhydrin-Reagens täglich neu angesetzt werden, das Biuret-Reagens hingegen konnte bei vorschriftsmäßiger Lagerung länger aufbewahrt werden. Diese Komponenten gaben den Ausschlag, die Biuret-Methode zu verwenden.

Hirsch und Cattaneo (57) untersuchten einige dieser Verfahren und gaben als empfindlichste Bestimmung die Methode nach Mizuta (84) an, gefolgt von den Methoden nach Leclerc und Khodababadeh (74) und Esser und Heinzler (32). Die Methode von Marenzil und Gomez (78) wurde als zu ungenau bezeichnet. Bei den eigenen Voruntersuchungen über eine geeignete Biuret-Methode, die wegen des Vergleiches mit der Kjeldahl-Methode von der gleichen Technik der Fibringerinnung ausgehen sollte, erschien die Biuret-Methode nach Goa (41) geeignet, die in "Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik"* zur Fibrinogenbestimmung modifiziert dargestellt ist.

- Prinzip:

Das wie in der Kjeldahl-Methode gewonnene Fibringerinnsel wird durch Alkali hydrolytisch gelöst und nach Zusatz von Benedict's-Reagens photometrisch gemessen.

- Reagenzien und Geräte:

zur Fibringewinnung s. Kjeldahl-Methode

1. 3%ige NaOH

2. Benedict's-Reagens: 173 g Natriumcitrat
+ 100 g Natriumcarbonat (siccum)
in 500-700 ml Aqua dest. unter Erhitzen gelöst und gefiltert
+ 17,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
in 100 ml Aqua dest. durch Erwärmen gelöst

ad 1000 ml mit Aqua dest. auffüllt und in dunkler Flasche aufbewahrt.

3. Spektralphotometer

* Behring-Werke AG, Marburg, 1966

- Ausführung:

Das Fibrinogeninnser von 0,5 ml Plasma wurde in einem Reagenzglas mit 4 ml 3%iger NaOH unter Schütteln gelöst, was oft nur unter großer Schwierigkeit möglich war. Danach wurden 0,2 ml Benedict's-Reagens zugegeben und bis zur Farbentwicklung nach 15 min. an einem Spektralphotometer bei 330 m μ gegen den Leerwert gemessen.

Zuvor wurde das Benedict's-Reagens (Fibrinogen-Biuret-Komplex gegen Biuret-Reagens-Leerwert) in einem Bereich von 210 - 360 m μ auf sein spezifisches Absorptionsmaximum untersucht, das bei 295 m μ lag. G o a (41) rechtfertigt die Messung in diesem Bereich mit einer viermal höheren Empfindlichkeit der Messung als im zweiten Absorptionsmaximum von 530 - 580 m μ . Nach H e n r y (55) sind allerdings störende Einflüsse durch Turbidität in diesem niedrigen Wellenbereich beträchtlich.

- Berechnung:

Der Fibrinogenwert sollte anhand von vergleichenden Kjeldahlbestimmungen über eine Eichkurve abgelesen werden. Folgende Messungen wurden als Einfachbestimmungen durchgeführt:

Nr.	Kjeldahl-Wert in mg%	Extinktion
1	161	0,317
2	410	1,090
3	251	0,386
4	369	0,845
5	188	0,247
6	339	0,920
7	418	0,950
8	396	1,020
9	310	0,543
10	454	1,075
11	225	0,280
12	400	1,165
13	347	0,820
14	193	0,538
15	251	0,650
16	229	0,665
17	260	0,700
18	351	0,750
19	381	0,810
20	456	0,895
21	381	0,782
22	573	1,450

Die graphische Darstellung dieser Werte (Abb. 1) läßt zwar eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Extinktion und den zugehörigen Kjeldahlwerten erkennen und stimmt auch im Größenbereich mit der Eichkurve von G o a (41) überein, die bis zu 200 mg% für die Gesamtelweißbestimmung des Liquors bestimmt war; aber die starke Streuung ließ eine exakte Auswertung nicht zu, so daß auch keine Umrechnung vorgenommen wurde.

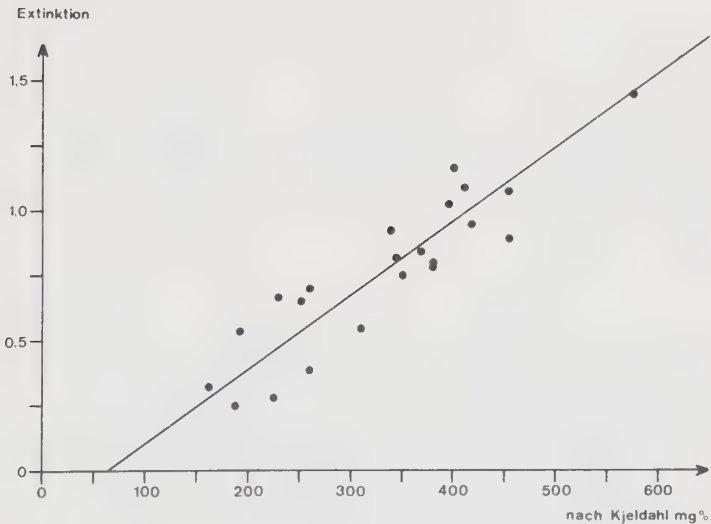


Abb. 1. Regressionsgerade (y aus x geschätzt⁺).
Fibrinogenwerte nach Kjeldahl in mg% aus 1 ml
Plasma und ihre Extinktionen aus 0,5 ml Plasma.
⁺ (nicht berechnet, nach Augenmaß)

Diese Methode wäre insoweit zufriedenstellend gewesen, wenn noch eine genauere Fehlersuche und weitere Bestimmungen vorgenommen worden wären, die über das Vorversuchsstadium hinausgegangen wären. Die Notwendig-

keit eines besonderen Filters oder gar eines Spektralphotometers und eines Spezialreagens bei Anwendung dieser Methode führten zu dem Gedanken, eine Methode zu suchen, bei der auf Spezialapparaturen bzw. -reagenzien verzichtet werden konnte.

So wurde mehr und mehr eine Angleichung an die Biuret-Gesamteiweiß-Bestimmungsmethode nach W e i c h s e l - b a u m (130) erwogen, die in jedem Labor durchgeführt wird. Bei diesen Überlegungen mag die Einfachheit einer solchen Kombinationsmethode im Vordergrund gestanden haben. Genauigkeit und Schnelligkeit mußten sich in den folgenden Vorversuchen zeigen.

- Vorversuche zu einer modifizierten Biuret-Methode nach Weichselbaum

Es wurde versucht, eine Methode zu entwickeln, die mit den im Labor zur Gesamteiweißbestimmung notwendigen Reagenzien und Geräten auskam: einem Eppendorff-Photometer mit dem Filter Hg 546 m μ und dem Biuret-Reagens nach Weichselbaum.

Zunächst mußten aber folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie unterscheiden sich die Absorptionskurven der Biuret-Reaktion von Albumin, Globulin und Fibrinogen untereinander bei gleichem Konzentrationsverhältnis unter Verwendung von Biuret-Reagens nach Weichselbaum?
2. Reicht das Biuret-Reagens nach Weichselbaum für eine genaue Fibrinogenbestimmung aus?
3. Welche Eiweiß- bzw. Fibrinogen-Konzentration ist im Reaktionsansatz notwendig, um dem Lambert-Beer'schen Gesetz zu genügen?

ad 1.

Ohne genauer auf die unterschiedliche chemische Struktur der einzelnen Bluteweisse einzugehen, weiß man, daß sich die Anzahl der Peptidbindungen des Albumins, Globulins und Fibrinogens voneinander unterscheidet. Ihr Anteil ist bei der Biuret-Reaktion ($2 - CO-NH_2$) wesentlich und wirkt sich damit auf die Absorption aus. Nach Messung der Extinktion in bezug auf die nach Kjeldahl bestimmten Stickstoffgehalte der drei einzelnen Bluteweisse ließen sich drei verschiedene Geraden darstellen. All dies ist bereits schon unter-

sucht worden, und zumindest die Absorption des Albumins und Globulins in Normalserum ist in der Literatur als nahezu identisch angegeben worden (42, 55, 79, 108). Beide Eiweiße werden ja auch bei der Gesamteiweißbestimmung zusammen bei 546 m μ gemessen. Die Absorption der beiden gegenüber Fibrinogen ist von E s s e r und H e i n z l e r (32) dargestellt (Abb. 2), die daraus den Schluß zogen, die Extinktion bei 490 m μ zu messen, weil bei dieser Wellenlänge alle Plasmaeiweiße die gleiche Extinktion haben. Abbildung 2 zeigt aber auch, daß die Absorptionskurve und Eichkurve des Fibrinogens zwischen denen des Albumins und des Globulins liegen.

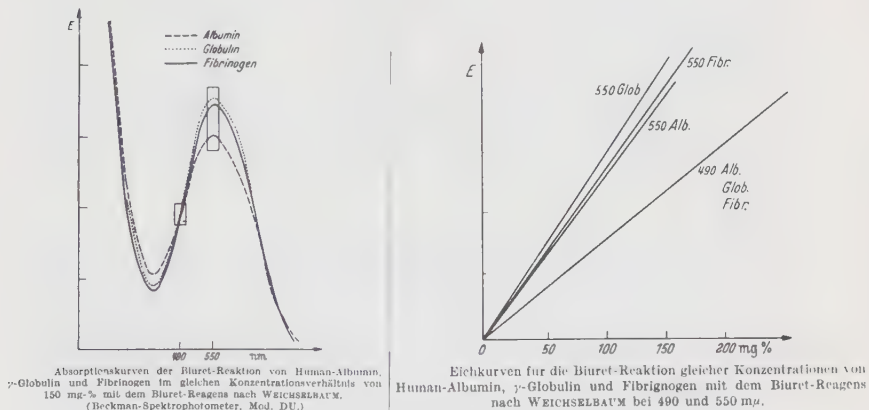


Abb. 2. Beide Abbildungen wurden der Arbeit von E s s e r und H e i n z l e r (32) entnommen.

Die Extinktion des Gesamteiweißes, das Albumin und Globulin zusammenfaßt, wird aber bei 546 m μ gemessen, so daß diese Wellenlänge auch bei der Bestimmung von Fibrinogen zugrundegelegt werden kann. H e n r y (55) schreibt unter Bezugnahme auf W a r e (129) und M a r n e r (79), daß das Biuret-Farbäquivalent für Fibrinogen das gleiche ist wie für Albumin und Globulin.

ad 2.

Zur Beantwortung der zweiten Frage galt es, das Biuret-Reagens nach *Weichselbaum* (130) in der Literatur zu vergleichen mit dem nach *Klingsley* (69), nach *Mehli* (82), nach *Wolfsone et al.* (132), nach *Gornall et al.* (46), nach *Mizuta* (84) und dem Benedict's-Reagens (41). Die aufgezählten Reagenzien unterscheiden sich weniger in ihrer Bestimmungsqualität als in ihrer Stabilität, wobei das Reagens nach *Weichselbaum* lediglich vom Benedict's-Reagens übertroffen werden soll (55). Das in neuerer Zeit verwendete Phenol-Biuret-Reagens nach *Lowry* (77), das auf dem Folin-Ciocalteu-Reagens beruht, aber den Eiweißwert nicht über den Tyrosin-gehalt berechnet, soll durch Anwesenheit von Cu-Ionen eine um 100fach größere Empfindlichkeit als die Biuret-Reaktion zeigen und besonders zur Messung sehr geringer Eiweißmengen geeignet sein (42, 43, 44, 104).

Zusammenfassend kann das Biuret-Reagens nach *Weichselbaum* zur Fibrinogenbestimmung verwendet werden, wenn es auch nicht ganz so empfindlich ist wie das Benedict's-Reagens oder gar das Phenol-Biuret-Reagens nach *Lowry*.

ad 3.

Die Frage nach dem notwendigen Reaktionsansatz bezieht sich letztlich auf das richtige Verhältnis zwischen Eiweißkonzentration und Kupferkonzentration, die sich zu Chelatkomplexen zusammenlagern, die konstante Farbe bilden und damit dem Lambert-Beer'schen Gesetz genügen. *Mehli* (82) sieht das erfüllt, wenn das Verhältnis zwischen Eiweiß und Kupfer 3 : 1 beträgt. *Gornall et al.* (46) halten bei Eiweißkonzentrationen unter 4 % eine endgültige Kupferkonzentration von 0,06 % im Ansatz für notwendig, damit das Lambert-Beer'sche Gesetz gewahrt bleibt. Nach *Henning* (54) gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz unter Verwendung von *Weichselbaum*-Reagens bei Konzentrationen von 0,004 - 0,160 g% Eiweiß im Reaktionsansatz.

Nach diesen Vorüberlegungen mußte bei einer Fibrinogenbestimmungsmethode, die sich an einer Gesamteiweißbestimmungsmethode orientieren sollte, zunächst eine Angleichung an deren Meßbereich und deren Reaktionsansatz erfolgen. Die in dem Labor verwendete Gesamteiweißbestimmung wurde nach einer Laboranleitung von E. Merck, Darmstadt, leicht modifiziert durchgeführt:

Zu 0,02 ml Serum wurde 1 ml Biuret-Reagens nach Weichselbaum gegeben und nach mindestens 25 min. Stehzeit im Dunkeln bei Zimmertemperatur die Extinktion der Analyse gegen die gleiche Menge Biuret-Reagens + 0,02 ml physiologische Kochsalzlösung als Leerwert mit dem Eppendorf-Photometer bei 546 m μ gemessen.

Bei dieser Mikromethode handelt es sich um eine vereinfachte Ausführungsform; inwieweit hier eine Anpassung der Fibrinogenbestimmungsmethode erfolgen konnte, mußte sich zeigen.

- Angleichung an den Meßbereich:

Zunächst mußte bei der Angleichung des Meßbereiches beachtet werden, daß das Gesamteiweiß bei dieser Methode mit einem Normalbereich von 6,2 - 8,5 g% beim Erwachsenen angegeben war. Bei Verwendung derselben Methode für Fibrinogenbestimmung mußte der um eine Kommastelle niedriger liegende Fibrinogen-Normalbereich von 0,2 - 0,4 g% zugrundegelegt werden. Deshalb wurde zur Kontrolle des Lambert-Beer'schen Gesetzes bei dieser speziellen Mikromethode und gleichzeitig zur Kontrolle des Photometers mit dem Merck-Serum-Standard⁺ von 6 g% eine Verdünnungsreihe von 600 - 6000 mg% in einem Ansatz von 0,1 ml hergestellt und in einer Mikroküvette deren Extinktion gemessen. Die sich ergebende Eichkurve (Abb. 3) zeigte einen linearen Verlauf und wurde mit Versatol-Standard⁺⁺ von 7,2 g% Gesamteiweiß, also von 720 - 7200 mg%, verifiziert (Abb. 4).

Da diese Verdünnungsreihen von 600 mg% ausgingen, blieben die unter diesem Bereich zu erwartenden Fibrinogenwerte unberücksichtigt. Eine Darstellung dieser Werte durch Extrapolation der Eichkurve ist unstatthaft, so daß der bereits 1 : 10 verdünnte Serum-Standard in einer Verdünnungsreihe bis zu 60 mg% verdünnt und die zugehörige Extinktion bestimmt werden mußte. Um in diesem Bereich zu überprüfen, ob der Serum-Standard auch für Fibrinogenbestimmungen verwendet werden kann, wurde gleichzeitig eine Verdünnungsreihe mit Rinderfibrinogen⁺⁺⁺ im gleichen Bereich hergestellt.

⁺ Hersteller: E. Merck AG, Darmstadt

⁺⁺ Hersteller: Warner Chilcott Laboratories,
Morris Plains / USA

⁺⁺⁺ Hersteller: Behring-Werke AG, Marburg

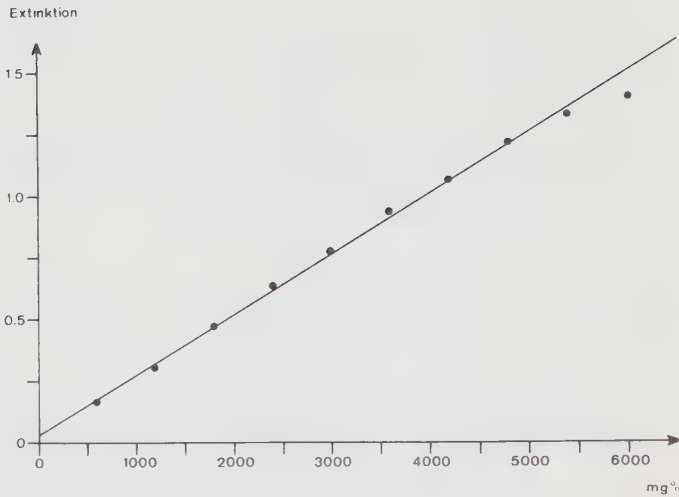


Abb. 3. Eichkurve mit Merck-Serum-Standard von 6000 auf 600 mg% verdünnt. (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

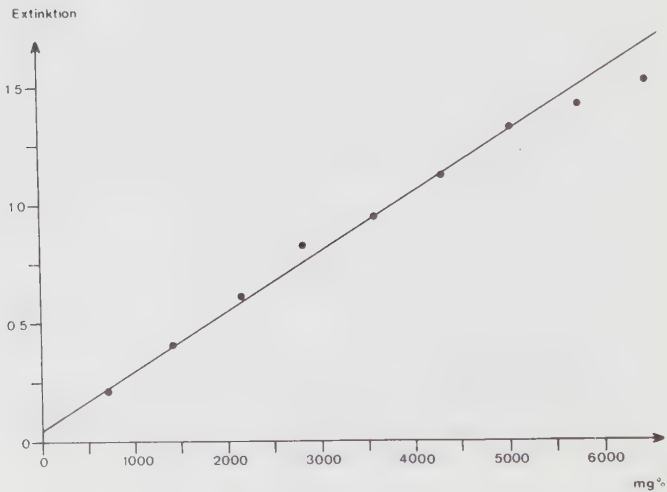


Abb. 4. Eichkurve mit Versatol-Standard von 7200 auf 720 mg% verdünnt. Wegen des besseren Vergleiches mit Abb. 3 ohne 7200 mg%. (Mittelwerte aus Doppelbestimmungen)

Dabei wurde von einer Fibrinogenlösung von 600 mg% ausgegangen, deren Konzentration mit der Kjeldahl-Methode kontrolliert worden war (Abb. 5).

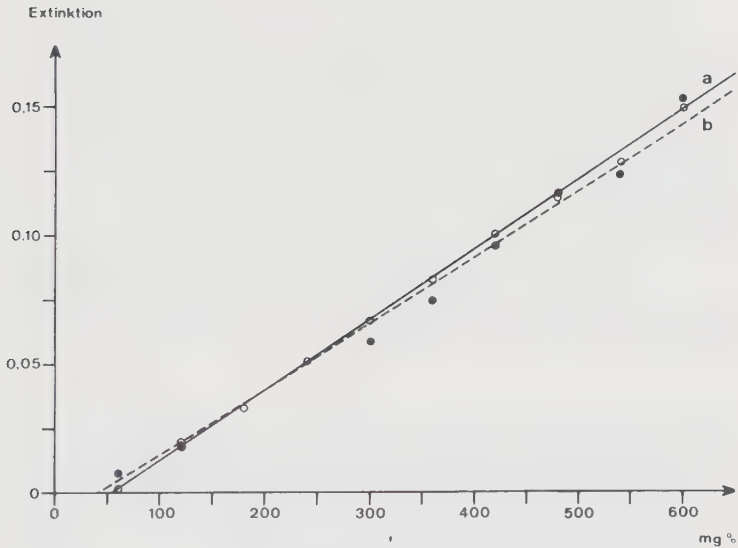


Abb. 5. a) Eichkurve mit 10fach verdünntem Merck-Serum-Standard von 600 auf 60 mg% verdünnt.
b) Eichkurve mit Rinderfibrinogen-Lösung in einer Verdünnung von 600 auf 60 mg%.
a) und b) = Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Bei der Beurteilung der beiden Eichkurven in Abbildung 5 zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung. Auf die Verwendung von Proteinstandard zur Messung aller Eiweißproteine einschließlich Fibrinogen sei verwiesen (102, 104). Der weitere lineare Verlauf der Eichkurve auch in diesem unteren Bereich deutet auf die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes hin. Der Bereich unter 60 mg% muß den praktischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Durch einen entsprechenden Reaktionsansatz - innerhalb der gleichen Kommastelle - mußte es möglich sein, in einen höheren Meßbereich der Eichkurve zu gelangen, wenn auch nicht in den gleichen, in dem die hohen Gesamteiweißwerte gemessen wurden.

- Angleichung an den Reaktionsansatz

Die Fibrinogen-Bestimmung nach dieser Gesamteiweißmethode mußte allerdings - im Gegensatz zu der oben verwendeten reinen Fibrinogenlösung - von einem Fibringerinnsel bzw. Fibrinpräzipitat aus einer bestimmten Plasmamenge ausgehen. Beim Vergleich der Normalwerte von Gesamteiweiß und Fibrinogen erschien gegenüber der Serummenge eine zehnmal höhere Plasmaausgangsmenge angebracht:

	Normalbereich	Ansatz	Biuret-Reagens
Gesamteiweiß:	6,2 - 8,5 g%	0,02 ml Serum	1 ml
Fibrinogen:	0,2 - 0,4 g%	0,20 ml Plasma	1 ml

Während die 0,02 ml Serum direkt mit dem Biuret-Reagens reagierten, zeigte sich in Versuchen, daß der Alkali-Gehalt von 0,2 M NaOH im Reagens nicht zur Lösung des Fibringerinnsels ausreichte. Auch eine Erwärmung, die sich wegen der Empfindlichkeit des Biuret-Reagens nur in engen Grenzen halten mußte, bewirkte keine Hydrolyse der Fibrinflocke. Sie mußte vor der Zugabe von 1 ml Biuret-Reagens durch eine Menge Alkali hydrolytisch gelöst werden, die einem Mengenäquivalent von 0,02 ml Serum entspricht und das Biuret-Reagens nicht beeinflussen durfte. Deshalb wurden dem Fibringerinnsel 0,02 ml NaOH beigegeben, die in den ersten Versuchen 2 n, später 1 n, war. Damit stand folgender Ansatz für die Fibrinogenbestimmung endgültig fest:

Fibringerinnsel aus 0,2 ml Plasma
+ 0,02 ml NaOH
+ 1,00 ml Biuret-Reagens

Mit diesem Ansatz war im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Makro-Fibrinogenbestimmungsmethoden nach Schulz und Kjeldahl mit 1 ml Plasma-Ansatz der Weg zu einer Mikrobestimmungsmethode beschritten, die bei der Isolierung des Fibrinogens aus dem Plasma neuer Überlegungen bedurfte.

- Isolierung des Fibrinogens

Wie bereits angedeutet, wurde zur Trennung des Fibrinogens von den anderen Bluteiweißkörpern auch bei dieser Methode der physiologische Weg der Gerinnung gewählt. Die Salzausfällung des Fibrinogens mit anschließender Biuret-Bestimmung (3, 20, 78, 84) soll durch unvollständige Ausfällung des Fibrinogens bzw. Mitfällung verschiedener anderer Proteinfractionen oft die Ursache für niedrige bzw. hohe Fibrinogenwerte sein (37, 85). Auf die Fehler, die durch Bildung des Fibringerinnsels durch CaCl_2 entstehen können, wurde bei der Kjeldahl-Methode hingewiesen. Die Hitze- und Na_2SO_3 -Ausfällung des Fibrinogens und die enzymatische Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin wurden von G o o d w i n (43) nach anschließender modifizierter Biuret-Methode und Phenol-Biuret-Methode verglichen. Die Fibrinogenwerte dieser drei Isolationstechniken unterschieden sich nur wenig und bestätigten andere Untersuchungen (31, 42). Auf die Abhängigkeit dieser letztgenannten Isolierungsmethoden vom verwendeten Antikoagulant wird von B r a c k e n - r i d g e (16) hingewiesen.

Die Angaben über die Zuverlässigkeit der einzelnen Isolierungstechniken in der Literatur sind unterschiedlich; der physiologischen Methode, der Umwandlung des löslichen Fibrinogens in das unlösliche Fibrin, wurde der Vorrang gegeben, zumal bei der zu vergleichenden Kjeldahl-Methode das gleiche Prinzip zugrundegelegt worden war.

Bei einer Mikromethode, zu der sich diese Biuret-Methode aus den Vorversuchen entwickelt hatte, konnte die Technik der Fibrindarstellung, wie in der durchgeführten Methode nach Kjeldahl, nicht mehr angewendet werden. Das Gerinnsel war zu klein geworden, um auf einen Glasstab gewickelt zu werden. Eine Methode war zu finden, die die Technik vereinfachen und die Inkubationszeit von 1 h im Brutschrank verkürzen sollte. Sie durfte sich aber in der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin nicht wesentlich von der Kjeldahl-Methode unterscheiden, um schon dadurch unterschiedliche Vergleichswerte auszuschalten.

Wie aus der Übersicht der Fibrinogenbestimmungen in der Einleitung ersichtlich, wird die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin in neuerer Zeit meist rein enzymatisch, nur mit Thrombin-Lösung, vorgenommen. Dadurch wird gegenüber der Recalcifikation der bereits erwähnte Salzfehler (119) ausgeschlossen und die bei der Recalcifikation benötigte Zeit wesentlich verkürzt.

Auch mit gereinigten Fibrinogenlösungen wurde die Abhängigkeit der enzymatischen Gerinnung vom pH, von der Thrombin- und Puffer-Konzentration und von der Temperatur untersucht (35, 85, 113), wobei die beiden letztgenannten Faktoren wesentlich die Gerinnungszeit beeinflussen. All diese Faktoren mußten berücksichtigt werden unter der Synopse mit der beschriebenen Kjeldahl-Bestimmung. Reine Thrombinlösung konnte deshalb nicht verwendet werden. Folgender Mittelweg wurde gewählt: Die Verwendung von Gerinnungsreagens, wie bei der Kjeldahl-Methode, und Thrombin-Lösung ohne Berücksichtigung des pH.

- Verdünnung des Plasmas

Im Hinblick auf die frühere Diskussion über die Plasma-verdünnungsmenge wurden Versuche angestellt, die bei Verwendung von nur 0,2 ml Plasma die 3fache Menge der Kjeldahl-Methode (also 6 ml Gerinnungsreagens) mit der 10fachen Menge (also 2 ml Gerinnungsreagens) vergleichen sollten. Die anschließenden Fibrinogenbestimmungen ergaben keine unterschiedlichen Werte, so daß sich 2 ml Gerinnungsreagens (gleiche Zusammensetzung wie bei Kjeldahl) als ausreichende Plasma-verdünnung erwiesen hatten. Dazu wurden 0,05 ml Thrombinlösung gegeben, anfangs in einer Konzentration von 60 N.I.H./ml⁺ und später von 3,2 N.I.H./ml⁺⁺. Um die kürzeste Gerinnungszeit zu ermitteln, nach der ein vollständiges Gerinnsel zu erwarten war, wurden mehrere Ansätze vom selben Plasma im Brutschrank bei 37° C 5, 15, 30 und 40 min. lang inkubiert. Nach Ermittlung der entsprechenden Fibrinogenwerte zeigten sich keine Unterschiede, so daß angenommen werden konnte, daß die Gerinnselbildung bereits nach 5 min. vollständig war. Dieses Ergebnis wird in der Literatur bestätigt (104).

- Darstellung und Waschung des Gerinnsels

Das Gerinnsel mußte aus der gallertartigen Masse gewonnen werden. Manipulationen mit einem Glasstab in dem schmalen Reagenzglas waren technisch schwer durchführbar. Deshalb wurde das Gerinnsel von der Plasma-verdünnung abzentrifugiert (34, Haury⁺⁺⁺), was zuerst auch unter Verwendung von Kunststoffpartikeln, die eingeschlossen im Gerinnsel dessen bessere Abzentrifugation ermöglichen sollten, nur schwer möglich war. Wie die später standardisierte Technik zeigt, ist nach einer

⁺ ORHT 60 N.I.H.-Einheiten/ml Test-Thrombin
Hersteller: Behring-Werke AG, Marburg

⁺⁺ Antithrombin-Reagens
Hersteller: Hoffmann-La Roche, Grenzach

⁺⁺⁺ "Fibrinogen", Laboranleitung der Fa. Haury, München

entsprechenden Vorbehandlung, Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer eine gute Isolierung des Gerinnsels möglich.

Um das in dem Gerinnungsreagens enthaltene CaCl_2 und eventuelle Proteine, die in dem Fibringerinnsel enthalten sein können, auszuwaschen, ist eine exakte Reinigung des abzentrifugierten Gerinnsels notwendig. Dieses wurde in 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschüttelt und 5 min. zentrifugiert. In drei Versuchen wurde dieser Vorgang einmal, zweimal und dreimal durchgeführt und die Fibrinogenwerte der unterschiedlich gewaschenen Gerinnsel bestimmt. Dabei waren die Fibrinogenwerte der Proben, die nur einmal der oben genannten Waschungsprozedur unterworfen waren, höher als die, bei denen der Vorgang wiederholt oder sogar dreimal durchgeführt worden war. Die Werte bei einer zwei- oder dreifachen Waschung unterschieden sich nur wenig voneinander. Deshalb wurde das Gerinnsel zweimal bei bestimmter Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeit gewaschen.

- Lösung des Gerinnsels

Die Auflösung der gewaschenen Fibrinflocke war das Hauptproblem der modifizierten Biuret-Methode. Zur Lösung des Fibringerinnsels war, dem Ansatz entsprechend, nur eine sehr kleine Menge eines Lösungsmittels möglich, so daß zunächst 0,02 ml 2 M NaOH verwendet wurden. NaOH in dieser verhältnismäßig hohen Konzentration gegenüber dem Anteil von 0,2 M NaOH im Biuret-Reagens, aber in so geringer Menge gegenüber dem 1 ml Biuret-Reagens, konnte die Farbreaktion nicht beeinträchtigen, wie die Ergebnisse später zeigten.

Bei den ersten Vorversuchen wurden 0,02 ml 2 M NaOH und 1 ml Biuret gleichzeitig zu dem Fibringerinnsel gegeben. Die Auflösung des Gerinnsels war bei Zimmertemperatur allerdings erst nach 2 h vollständig. Die nach dieser Zeit gemessenen Extinktionen ergaben zwar eine Abhängigkeit von den Kjeldahl-Vergleichsmessungen, aber keine geradlinige Eichkurve. Die Zeit von 2 h war für die Praxis zu lang und außerdem problematisch, da die Farbentwicklung bei der Biuret-Reaktion nach 30 min. optimal ist und nach dieser Zeit im allgemeinen gemessen wird. Weichselbaum (130) konnte zwar auch nach 5 Tagen keine Änderung der Extinktion feststellen, was aber auf die stabilisierende Wirkung der von ihm im Ansatz verwendeten Harnstoff-Thymol-Lösung zurückzuführen war.

des 2. Versuches, die zuerst unter Hitze mit NaOH hydrolysiert und dann mit dem Biuret-Reagens zur Reaktion gebracht wurden. Die Extinktionen der unter Versuch 1 und Versuch 2 gelösten Gerinnsele stimmten gut überein und zeigen in Abbildung 6 eine geradlinige Abhängigkeit von den dazugehörigen Kjeldahl-Werten.

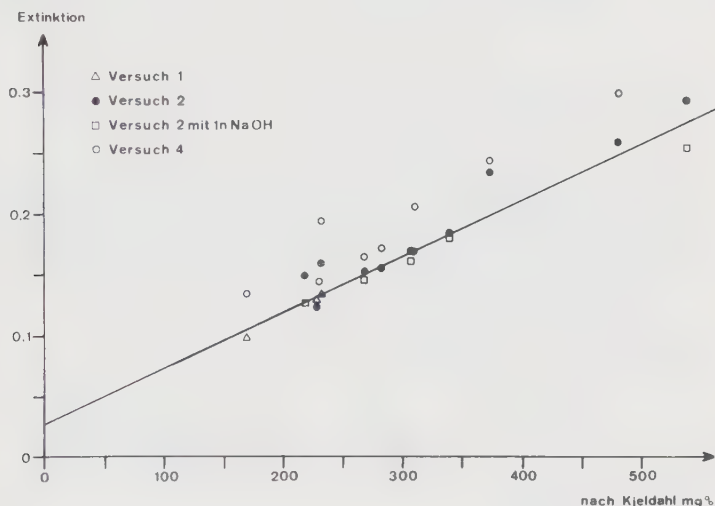


Abb. 6. Regressionsgerade (y aus x geschätzt⁺) für die Meßergebnisse des

1. Versuches: ohne Biuret-Reagens bei 37° C 30 min. Inkubiert.
2. Versuches: ohne Biuret-Reagens über dem Bunsenbrenner bis zur Lösung erhitzt.
2. Versuches mit 1 n NaOH anstelle 2 n NaOH

Die Meßergebnisse des 4. Versuches; mit Biuret-Reagens über dem Bunsenbrenner bis zur Lösung erhitzt - wurden bei der Schätzung der Geraden nicht berücksichtigt.

⁺ (nicht berechnet, nach Augenmaß)

Auf den Einfluß der Temperatur auf die Farbintensität des Biuret-Komplexes von Serum oder Plasmaproteinen hat Weichselbaum (130) bereits hingewiesen, als er die Extinktion von auf 50° C erhitztem Biuret mit der bei 32° C erfolgten Farbentwicklung

des Protein-Biuret-Komplexes verglichen und bei höherer Temperatur auch höhere Extinktionen fand. Er schaltete diesen Einfluß aus, indem er Standard- und Leerwert mit der zu messenden Probe zusammen bei 40°C - 50°C in ein Wasserbad stellte. Dies war hier bei der späteren Verwendung des gleichen Standards wie bei der Gesamteiweißbestimmung nicht möglich, so daß aufgrund der durchgeführten Versuche zuerst mit NaOH hydrolysiert und dann nach Erkalten Biuret hinzugefügt wurde.

Nach vergleichenden Untersuchungen mit 1 M und 2 M NaOH wurde kein Unterschied der Extinktionen festgestellt (s. Abb. 6), so daß bei den folgenden Versuchen 1 M NaOH verwendet wurde.

Um die zur Hydrolyse notwendige Erwärmung zu standardisieren, wurden weitere Versuche nach der 2. Versuchsanordnung gemacht, wobei die Proben in ein Wasserbad gestellt wurden, dessen Temperatur von 40°C über 45°C bis auf 50°C erhöht wurde. Die Auflösung der Gerinnssel war bei einer Temperatur von 50°C - von wenigen Ausnahmen abgesehen - nach 15 min. vollständig. Dabei zeigte sich innerhalb der Extinktion kein Unterschied. Bei der späteren, endgültigen Methode wurde die Hydrolyse 10 min. bei 60°C durchgeführt, um ganz sicher eine Auflösung aller Gerinnssel zu erzielen. Dabei wurden Reagenzgläser verwendet, die eine gute Bedeckung des Gerinnssels durch die geringe Menge NaOH ermöglichten. Am besten eigneten sich hierfür "Ferment"- und "Eiweiß"-Reagenzgläser.

- Biuret-Reaktionszeit

Um den Zeitaufwand der modifizierten Fibrinogen-Biuret-Methode möglichst gering zu halten, wurde die kürzeste Zeit zur maximalen Farbentwicklung des Biuret-Fibrinogen-Komplexes untersucht. Dabei mußte der Einfluß der Temperatur, wie bereits bei der Gerinnsellösung erwähnt, berücksichtigt werden. Die Stabilität der Lösung ohne spätere Trübung, die mehrere Stunden (108) bis mehrere Tage betragen soll, trat hier in den Hintergrund.

Bei Raumtemperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ist die angegebene Erhöhung der Extinktion von $0,7\ \%/^{\circ}\text{C}$ bei Routinebestimmungen zu vernachlässigen (55). Die Abhängigkeit der Farbentwicklung von der Zeit wurde durch die Extinktionen einer Verdünnungsreihe zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Dabei unterschieden sich die nach 25 min. abgelesenen Extinktionen kaum von denen, die nach 45 min. und auch nach Stunden bestimmt wurden. Die Farbentwicklung hatte demnach nach 25 min. ihr Maximum erreicht und blieb über Stunden konstant.

- Zusammensetzung des Leerwertes

Bei der Gesamteiweißbestimmung, die hier zur Vorlage diente, setzte sich der Leerwert aus 1 ml Bluretlösung und entsprechend der Serummenge aus 0,02 ml physiologischer Kochsalzlösung zusammen. Bei der angeglichene Fibrinogenbestimmung war es aber notwendig, anstelle der 0,02 ml physiologischer Kochsalzlösung 0,02 ml NaOH im Leerwert zu verwenden.

- Aufstellung der Eichkurve

Zur Feststellung des zu erwartenden Extinktionsbereiches und damit zur Erstellung der Eichkurve wurden Doppelbestimmungen der Fibrinogenwerte von 22 Personen nach der Kjeldahl-Methode durchgeführt und gegen die dazugehörigen Extinktionen aufgetragen. Die Extinktionen wurden nach 25 min. abgelesen, nachdem das Gerinnsel 15 min. bei 50° C gelöst worden war. Die graphische Darstellung (Abb. 7) deutet auf eine geradlinige Abhängigkeit der Mittelwerte hin.

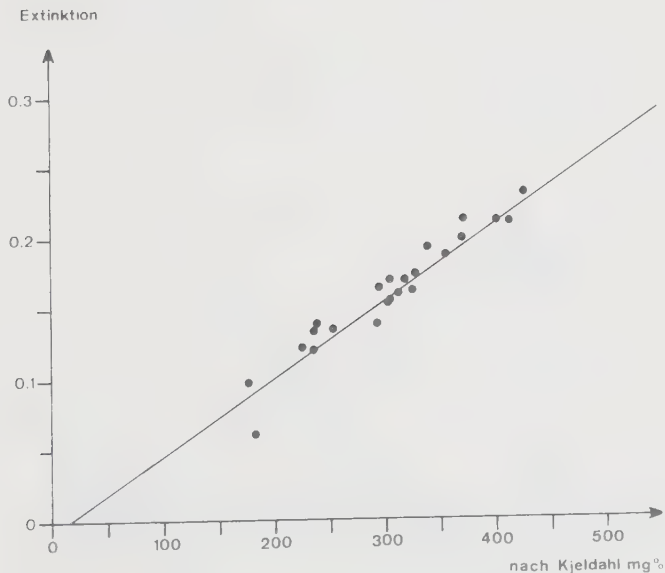


Abb. 7. Regressionsgerade (y aus x geschätzt*) für die Mittelwerte der Kjeldahl-Doppelbestimmungen und ihrer gemessenen Extinktionen.
* (nicht berechnet, nach Augenmaß)

Die Darstellung der Doppelbestimmungen zeigte bei den Extinktionen (Abb. 8) eine geringere Abweichung der Werte untereinander als die bei den Kjeldahl-Bestimmungen (Abb. 9).

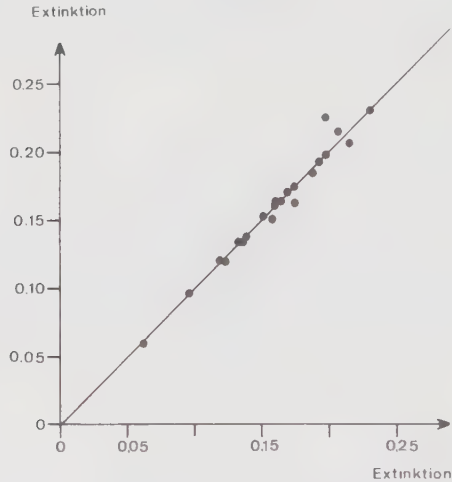


Abb. 8. Doppelmessungen der Extinktionen um die Idealgerade mit der Steigung $m = 1$

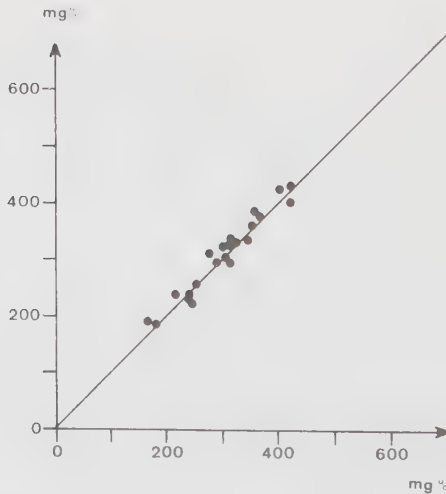


Abb. 9. Doppelbestimmungen der Kjeldahlwerte um die Idealgerade mit der Steigung $m = 1$

Nach Abb. 7 sind Fibrinogenwerte bis 600 mg% in einem Extinktionsbereich bis zu 0,3 zu erwarten. Diese Gerade präsentiert allerdings hauptsächlich Werte von 200 - 400 mg% und diente der Vororientierung.

Zur Aufstellung einer Eichkurve mußte eine Verdünnungsreihe aufgestellt werden, die besonders die unteren Bereiche ausleuchten und damit die unterste Grenze der Bestimmungsmöglichkeit festlegen sollte. Dazu wurde Plasma mit einem Fibrinogengehalt von 230 mg% und eines von 240 mg%, deren Fibrinogenwert mehrmals nach der Kjeldahl-Methode bestimmt worden war, bis auf 23 bzw. 24 mg% verdünnt. Bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin in den 0,2 ml Plasmaansätzen waren die Gerinnsel der hohen Plasmaverdünnungen makroskopisch nur noch schwer zu erkennen. Bei der Messung der Extinktion in der Mikroküvette fiel auf, daß bei dem Ansatz mit einem Gehalt von 24 mg% nur noch ein ganz geringer, bei dem Ansatz von 23 mg% überhaupt kein Extinktionswert gegenüber dem Leerwert abgelesen werden konnte. Die Eichkurve (Abb. 10), die aus den Werten beider Verdünnungsreihen aufgestellt wurde, liegt im gleichen Extinktionsbereich wie bei den Versuchen vorher, von 0,014 - 0,3.

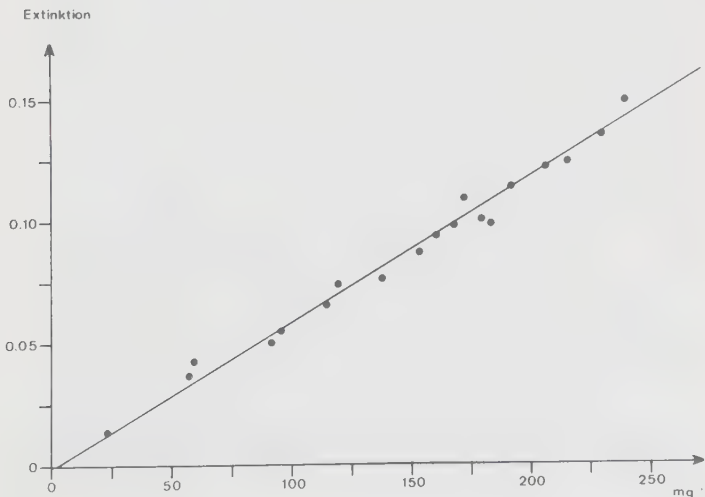


Abb. 10. Eichkurve der Kjeldahlwerte mit ihren zugehörigen Extinktionen von zwei Verdünnungsreihen (Plasma): 24 - 240 mg% und (23) - 230 mg%.

Dabei dürfte der untere Wert die unterste Bestimmbarkeitsgrenze darstellen, die hier 24 mg% Fibrinogen entsprach.

Der Extinktionsbereich dieser Eichkurve war doppelt so hoch wie bei den in der Angleichung an den Meßbereich erstellten Eichkurven mit Gesamteiweiß- und Rinderfibrinogen-Standard, weil dort von 0,01 ml Standard ohne nachfolgende Gerinnungsbildung und nicht von 0,2 ml Plasma ausgegangen worden war.

Ähnliche Eichkurven wie die der Plasma-Verdünnung ergaben sich bei Verwendung von entsprechend verdünntem Rinderfibrinogen, das ebenfalls mit Thrombin + Gerinnungsreagens zur Gerinnung gebracht und anschließend bestimmt wurde. Dabei muß darauf hingewiesen werden, daß Versuche mit rein-dargestelltem Fibrinogen nicht uneingeschränkt denen gegenübergestellt werden dürfen, bei denen Fibrinogen aus dem Plasma isoliert und dann bestimmt wurde. Schuman (123) hat in diesem Zusammenhang auf einen "Fibrin-Serum-Faktor" hingewiesen, der proteinischer Herkunft sein und im gereinigten Fibrinogen nicht vorkommen soll (85, 113).

Die Ermittlung eines Umrechnungsfaktors anhand der Eichkurve konnte entfallen, da bei den weiteren Vorversuchen anstelle des Eppendorf-Photometers ein "Calculating Absorptiometer" verwendet wurde. Mit diesem Gerät wurde die Extinktion der Blureaktion sofort mit einem elektronisch gespeicherten Faktor, der wöchentlich mit einem Standard kontrolliert wurde, umgerechnet und als fertiger Eiweißendwert ausgedruckt. Damit entfiel bei der Routinebestimmung die Notwendigkeit einer Eichkurve. Als Standard wurde Versatol** verwendet, das mit einer Konzentration von 7,2 g% Totalprotein bei der Angleichung an den Meßbereich bereits vorher am Eppendorf-Photometer untersucht worden war. Die Angleichung der Gesamteiweiß- und Fibrinogen-Bestimmungsmethode machte es möglich, an diesem Gerät beide Methoden unter den gleichen Bedingungen auszuführen. Die berechneten unterschiedlichen Ausgangsmengen erlaubten, den ausgedruckten Endwert bei der Gesamteiweißbestimmung mit Kommastelle als Gesamteiweißkonzentration in g%, bei der Fibrinogenbestimmung ohne Kommastelle als Fibrinogenkonzentration in mg% abzulesen. Zur Berücksichtigung der 0,5 ml Natriumcitratlösungs-

* LKB 7400, Hersteller: LKB-Produkter AB,
Stockholm/Sweden

** Hersteller: Warner Chilcott Laboratories,
Morris Plains / USA

anteile an den 5 ml Citratblut, mußten - wie bei der Kjeldahl-Bestimmung - zu dem ausgedruckten Endwert noch 10 % dieses Wertes addiert werden.

Nach einigen Vorversuchen mit dem "Calculating Absorptiometer" stand folgende modifizierte Biuret-Methode zum Vergleich mit der Fibrinogen-Bestimmung nach Schulz und Kjeldahl fest.

6. Modifizierte Biuret-Fibrinogenbestimmung

- Prinzip:

Aus Citratplasma wird mit Hilfe von Thrombin- und CaCl_2 -Lösung Fibrinogen als Fibrin isoliert, anschließend gewaschen und hydrolysiert. Die alkalische Fibrinlösung reagiert mit dem Biuret-Reagens nach Weichselbaum (alkalisch stabilisierte Kupferlösung) unter Bildung eines tiefblauen Komplexes, dessen Extinktion am Photometer abgelesen wird. Die Fibrinogenkonzentration wird unter Verwendung desselben Standards wie zur Gesamteiweißbestimmung anhand einer Eichkurve bestimmt oder direkt an einem "Calculating Absorptiometer" abgelesen.

- Reagenzien und Geräte:

1. 3,8%ige Natriumcitratlösung
2. Gerinnungsreagens: CaCl_2 (H_2O frei) 0,85
NaCl 4,25
Aqua dest. ad 500 ml
3. Thrombinlösung⁺
3,2 N.I.H.-Einheiten pro ml
4. Physiologische Kochsalzlösung
5. 1 M NaOH
6. Biuret-Reagens nach Weichselbaum⁺⁺
7. Total-Protein-Standard Versatol⁺⁺⁺
8. 20 μl Eppendorf-Pipette
9. Automatischer Dosierer
10. Calculating Absorptiometer⁺⁺⁺⁺

⁺ Antithrombin-Reagens
Hersteller: Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach

⁺⁺ Hersteller: Fa. E. Merck, Darmstadt

⁺⁺⁺ Hersteller: Warner Chilcott Laboratories,
Morris Plains / USA

⁺⁺⁺⁺ LKB 7400, Hersteller: LKB-Produkter AB,
Stockholm/Sweden

- Ausführung:

1. Nach Blutentnahme und Zentrifugation wurden 0,2 ml Plasma vorsichtig abpipettiert und in ein Reagenzglas gegeben, in dem sich bereits 2 ml Gerinnungsreagens und 0,05 ml Thrombin-Lösung befanden.
2. Dieser Ansatz wurde geschüttelt und mindestens 5 min. im Brutschrank bei 37° C inkubiert.
3. Danach wurde die feste, gallertartige Masse durch Schlagen gegen den Handteller von dem Rand des Reagenzglases gelöst und 10 min. bei 3500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet.
4. Zu dem am Boden des Reagenzglases abgesetzten Fibrin wurden 5 ml physiologische Kochsalz-Lösung gegeben. Das Gerinnsel wurde darin aufgeschüttelt und 5 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert.
5. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Gerinnsel zum zweiten Male mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dabei wurde 5 min. bei 3500 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet.
6. Die Reagenzgläser mit dem abzentrifugierten Fibrin wurden umgekehrt in einen Reagenzglas-Ständer gestellt, damit auch noch verbliebene Flüssigkeitsmengen abtropfen konnten.
7. Dem trockenen Gerinnsel wurden mit einer Eppendorf-Pipette 0,02 ml 1 M NaOH hinzugegeben. Dabei mußte auf eine vollständige Bedeckung des Gerinnsels mit NaOH geachtet werden.
8. Das Reagenzglas wurde 10 min. lang in ein Wasserbad von 60° C gestellt.
9. Nach Abkühlung wurde mit dem automatischen Dosierer 1 ml Biuret-Reagens hinzugegeben und nach 25 min. der Fibrinogengehalt im "Calculating Absorptiometer" gegen den Leerwert (1 ml Biuret + 0,02 ml NaOH) bei Stellung "Gesamteisweiß" gemessen. Zur Messung mußte der Inhalt in Spezial-Küvetten aus Plastik umgeschüttet werden, die hinter der Leerwert-Küvette in einen Schlitzen gestellt und darin automatisch zu dem für den Wellenlängenbereich 545 m μ $\pm$ 5 durchlässigen Filter transportiert wurden.

10. Im "Calculating Absorptiometer" wurde die gemessene Extinktion mit dem elektronisch gespeicherten Versatol-Standard-Wert umgerechnet und der Fibrinogenwert ausgedruckt.
11. Der ohne Kommastelle abgelesene Wert zuzüglich 10 % (Zitratverdünnung) ergibt die endgültige Fibrinogenkonzentration in mg%.

Nach dieser modifizierten Methode konnten aufgrund der geringen Ansatzmengen 40 Doppelbestimmungen zum Vergleich mit der Kjeldahl-Methode und 27 Doppelbestimmungen zum Vergleich mit der Hitzefibrinogen-Methode durchgeführt werden.

7. Statistische Auswertungsmethoden

1. Berechnung der Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson-Bravais (112)
 - a. Im Sinne des Retest-Koeffizienten r_{tt} (75) zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Methode bei Meßwiederholungen zwischen Erst- und Zweitmessung desselben Verfahrens,
 - b. zur Prüfung des Zusammenhanges zwischen den drei Verfahren untereinander, wobei die aus den beiden Messungen gemittelten Werte der drei Meßmethoden in die Rechnung eingehen.
 2. Berechnung der zugehörigen Regressionsgeraden zur Schätzung der y-Werte aus x (112).
 3. Prüfung der Differenzen zweier Korrelationskoeffizienten auf Signifikanz anhand der Normalverteilung mit dem z-Test (112).
 4. Doppelte Varianzanalyse (112)
 - a. zur Prüfung der Unterschiede zwischen je zwei Methoden, wobei
 - Faktor 1 = Personen
 - Faktor 2 = Methoden
- Ist. Die Varianz zwischen den Verfahren wird dabei an der Restvarianz getestet.

- b. zur Prüfung des Meßfehlers. Üblicherweise wird in Form einer einfachen Varianzanalyse getestet, ob die Varianz innerhalb einer Person (nämlich die Streuung zwischen zwei Meßwiederholungen) kleiner ist als die zwischen den Personen bzw. umgekehrt die Streuung zwischen den Personen größer als innerhalb derselben. Zum Ausschluß eines möglichen Einflusses der Meßreihenfolge wurde

zu Faktor 1 = Personen
als Faktor 2 die Nummer der Messung

eingeführt (1. und 2. Wert). Die Varianzen beider Faktoren wurden an der Restvarianz, d. h. an dem unabhängig von der Reihenfolge der Messung bestehenden Meßfehler getestet.

5. t-Test für unverbundene Stichproben (118)

- a. zum Vergleich der männlichen und weiblichen Gruppe im Hinblick auf die Meßwerte der drei Methoden,
b. zum Vergleich der Hodgkin-Fälle mit Gesunden.

In den graphischen Darstellungen wurden die Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen des Mittelwertes s eingezeichnet, um die Gruppenungleichen anfangs im Hinblick auf ihre Streuung vergleichbar zu machen.

III. ERGEBNISSE

In den Tabellen I, II und III sind die Originaldaten der Bestimmungsergebnisse nach gesunden und kranken Personen und nach dem Geschlecht getrennt wiedergegeben (S. 50, 51, 52).

1. Zuverlässigkeit der Methoden

Zunächst wurde die Zuverlässigkeit der drei Methoden durch Vergleiche zwischen der jeweiligen ersten und zweiten Messung untersucht, da diese Zuverlässigkeit den Grad der Übereinstimmung zwischen den Methoden untereinander beeinflußt.

- Kjeldahl:

Die Korrelation zwischen der ersten und zweiten Messung ist mit einem Wert von $r = 0,9965$ extrem hoch und spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Meßwertverteilung bei Doppelbestimmungen. Da der Korrelationskoeffizient jedoch nur etwas über den Grad des Zusammenhanges zwischen zwei Werten aussagt, aber nicht ihre numerische Gleichheit prüft, wurde zusätzlich durch die Varianzanalyse geprüft, ob die Streuung zwischen den Meßwerten der verschiedenen Personen größer ist als die Meßfehlerstreuung, die nach Abzug des durch die Reihenfolge der Messung bedingten Varianzanteiles von der Gesamtvarianz verbleibt (Tab. IV).

Der F-Wert ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der ersten und der zweiten Messung, die Streuung zwischen den Personen aber ist um ein Vielfaches größer als die Streuung zwischen den Meßwerten innerhalb jeder Person (= Restvarianz).

Art der Varianz	Anz.d.Freiheitsgrade	Summe der Abw. quadrate	mittleres Abw. quadrat	F	p
Zwischen Personen	39	5554455,39	142421,93	551,83	<0,01
Zwischen 1. und 2. Messg.	1	667,01	667,01	2,58	n.s.
Rest	39	10065,49	258,09		
Total	79	5565187,89			

Tabelle IV. Varianzanalyse für die Meßwiederholungen bei Kjeldahl

Nr.	Geschl.	Alter	Diagnose	Kjeldahl Doppelbest.			Biuret Doppelbest.			abs. Diff.		
				1.W.	2.W.	M.W.	1.W.	2.W.	M.W.	Kj.	E	Kj/E
1	w	25	gesund	260	279	270	284	289	287	19	5	17
2	w	30	gesund	262	268	265	264	264	264	6	0	1
3	m	17	gesund	310	318	314	310	315	313	8	5	1
4	w	28	gesund	252	249	251	264	268	266	3	4	15
5	w	57	gesund	292	288	290	304	304	304	4	0	14
6	w	37	gesund	283	296	290	293	303	298	13	10	8
7	w	22	gesund	258	257	258	241	249	245	1	1	13
8	m	35	gesund	316	300	308	317	312	315	16	5	7
9	w	30	gesund	235	236	236	238	239	239	1	1	3
10	w	50	gesund	277	280	279	295	299	297	3	4	18
11	w	60	gesund	261	284	273	276	266	271	23	10	2
12	m	18	gesund	227	233	230	223	231	227	6	8	3
13	w	45	gesund	305	309	307	304	299	302	4	5	5
14	m	71	M. HodgkIn	586	579	583	598	601	600	7	3	17
15	m	35	M. HodgkIn	479	488	484	467	475	471	9	8	13
16	m	42	M. HodgkIn	1291	1231	1261	1242	1256	1249	60	14	12
17	m	32	M. HodgkIn	680	678	679	674	689	682	2	15	3
18	m	85	M. HodgkIn	628	638	633	596	596	596	10	0	37
19	w	47	M. HodgkIn	431	437	434	432	429	431	6	3	3
20	w	19	M. HodgkIn	593	578	586	582	586	584	15	4	2
21	w	32	M. HodgkIn	420	420	420	420	425	423	0	5	3
22	m	41	M. HodgkIn	624	630	627	646	651	649	6	5	22
23	m	23	M. HodgkIn	660	679	670	692	688	690	19	4	20
24	w	29	M. HodgkIn	527	541	534	535	534	535	14	1	1
25	m	20	M. HodgkIn	447	481	464	472	471	472	34	1	8
26	m	26	M. HodgkIn	433	424	429	407	438	423	9	31	6
27	w	54	M. HodgkIn	394	412	403	410	397	404	18	13	1
28	m	43	M. HodgkIn	335	353	344	358	354	356	18	4	12
29	w	39	Lebererkr.	180	184	182	180	188	184	4	8	2
30	m	47	Lebererkr.	193	194	194	195	190	193	1	5	1
31	w	54	Lebererkr.	146	142	144	150	155	153	4	5	9
32	m	57	Lymphosarkom	361	366	364	364	360	362	5	4	2
33	w	72	Lymphosarkom	665	700	683	678	682	680	35	4	3
34	m	45	Reticulosark.	605	578	592	594	622	608	27	28	16
35	m	50	Myelom	216	209	213	233	238	236	7	5	23
36	m	60	chr.lymphLeuk.	190	195	193	208	208	208	5	0	15
37	w	16	Nephrose	1223	1329	1276	1364	1359	1362	106	5	86
38	w	18	Nephrose	862	865	864	895	897	896	3	2	32
39	w	58	Dysfibrinog.	21	24	22	28	20	24	3	8	2
40	m	50	Thrombophleb.	263	270	267	264	268	266	7	4	1

Tabelle I. Bestimmungsergebnisse Kjeldahl-Biuret in mg%

Nr.	Ge-schl.	Alter	Diagnose	Kjeldahl	Hitze-Fbg	absolute Diff. zw. Kjeldahl und Hitze-Fbg
41	w	58	gesund	265	240	25
42	m	56	gesund	242	180	62
43	w	25	gesund	221	288	67
44	w	67	gesund	250	240	10
45	w	77	M. Hodgkin	471	430	41
46	m	56	M. Hodgkin	651	500	151
47	m	67	M. Hodgkin	813	130	683
48	m	38	M. Hodgkin	362	300	62
49	w	37	M. Hodgkin	520	370	150
50	m	53	M. Hodgkin	366	430	64
51	m	40	M. Hodgkin	442	370	72
52	w	36	M. Hodgkin	380	418	38
53	w	28	M. Hodgkin	495	370	125
54	w	42	M. Hodgkin	371	335	36
55	m	20	M. Hodgkin	666	625	41
56	w	33	M. Hodgkin	553	560	7
57	w	57	M. Hodgkin	480	500	20
58	w	61	Lebererkr.	240	240	0
59	w	24	Lebererkr.	203	210	7
60	m	66	Lebererkr.	179	168	11
61	m	33	Lebererkr.	162	148	14
62	m	63	Lymphosarkom	407	530	123
63	m	62	Lymphosarkom	376	370	6
64	m	61	Lymphoblastom	440	120	320
65	m	61	Lymphoblastom	347	330	17
66	m	52	chr. lymph. Leuk.	311	430	119
67	m	29	chr. myel. Leuk.	237	262	25
68	m	38	chr. myel. Leuk.	227	370	143
69	m	61	Osteomyeloskl.	229	300	71
70	w	62	Polycythäm.v.	262	300	38
71	m	69	Polycythäm.v.	356	530	174
72	w	44	ser. häm. Anämie	318	400	82
73	w	28	M. Werlhof	309	300	9
74	w	55	M. Werlhof	325	560	235
75	m	18	Hämophilie A	325	300	25
76	m	19	Hämophilie A	205	175	30
77	m	36	ess. Hyperlip.	266	370	104
78	w	30	L. erythemat.	406	530	124
79	m	50	M. Boeck	305	300	5
80	m	39	Seminom	372	430	58

Tabelle 11. Bestimmungsergebnisse Kjeldahl-Hitzefibrinogen in mg%

Nr.	Geschl.	Alter	Diagnose	Bluret Doppelbest.			HF Doppelbest.			abs. Diff. Doppelb.		
				I.W.	2.W.	MI.W.	I.W.	2.W.	MI.W.	B	HF	B/HF
81	m	64	gesund	356	347	352	282	300	291	9	18	61
82	m	48	gesund	344	339	342	300	370	335	5	70	7
83	w	56	gesund	261	264	263	288	228	258	3	60	5
84	m	16	gesund	268	270	269	240	270	255	2	30	14
85	w	29	gesund	333	333	333	418	300	359	0	118	26
86	w	69	gesund	293	297	295	363	300	332	4	63	37
87	w	20	gesund	334	336	335	370	500	435	2	130	100
88	w	37	gesund	230	241	236	228	228	228	11	0	8
89	w	51	gesund	263	262	263	300	300	300	1	0	37
90	w	56	gesund	265	262	264	288	335	312	3	47	48
91	m	51	gesund	311	311	311	335	356	346	0	21	35
92	m	67	gesund	310	320	315	430	356	393	10	26	78
93	w	29	gesund	286	288	287	288	335	312	2	47	25
94	w	73	M. HodgkIn	333	344	339	363	300	332	11	63	7
95	m	32	M. HodgkIn	515	532	524	500	512	506	17	12	18
96	m	45	M. HodgkIn	583	591	587	418	430	424	8	12	163
97	w	50	M. HodgkIn	477	473	475	370	314	342	4	56	133
98	m	35	M. HodgkIn	635	638	637	370	382	376	3	12	261
99	w	18	M. HodgkIn	362	365	364	500	430	465	3	70	101
100	w	22	M. HodgkIn	381	389	385	418	418	418	8	0	33
101	m	60	M. HodgkIn	499	504	502	400	356	378	5	44	124
102	m	44	M. HodgkIn	436	443	440	370	382	376	7	12	64
103	m	70	M. HodgkIn	898	912	905	745	745	745	14	0	160
104	m	51	M. HodgkIn	617	636	627	530	500	515	19	30	112
105	m	67	Lymphosarkom	387	385	386	400	437	419	2	4	33
106	w	57	chr.lymphLeuk.	481	466	474	300	430	365	15	130	109
107	m	60	chr.myel.Leuk.	547	540	544	370	356	363	7	14	181

Tabelle III. Bestimmungsergebnisse Bluret-Hitzefibrinogen in mg%

- Bluret:

Auch der Korrelationskoeffizient zwischen den zwei Meßwerten der Bluret-Methode deutet mit $r = 0,9994$ auf eine extrem hohe Zuverlässigkeit der Methode hin. Die Tatsache, daß ein auf dem 5 % Niveau signifikanter Unterschied zwischen den ersten und zweiten Messungen in der Varianzanalyse nachgewiesen wird (Tabelle V), läßt sich wahrscheinlich als Zufallsfehler interpretieren. Die absoluten Differenzen zwischen dem ersten und zweiten Wert sind besonders gering bei diesem Verfahren (Tabelle I). Trotzdem ist, gemessen an der Reststreuung bei dieser Stichprobe von $n = 40$, der zweite Wert im Durchschnitt geringfügig höher als der erste. Betrachtet man jedoch die Mittelwerte aller 67 Fälle mit Bluret-Doppelbestimmung bei der ersten und zweiten Messung, so ergibt sich für Meßwert 1 ein Mittelwert von $422,42 \pm 230,7$ und für Meßwert 2 ein solcher von $425,42 \pm 232,3$, so daß kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar ist.

Art der Varianz	Anz.d.Freiheitsgrade	Summe der Abw.quadrate	mittleres Abw.quadrat	F	p
Zwischen Personen	39	5825748,20	149378,16	385,41	$< 0,01$
Zwischen 1. und 2. Messg.	1	174,05	174,05	4,67	$< 0,05$
Rest	39	1454,95	37,31		
Total	79	5827377,20			

Tabelle V. Varianzanalyse für die Meßwiederholungen bei Bluret

- Hitzefibrinogen:

Die Retest-Korrelation zwischen den zwei Werten der Hitzefibrinogen-Methode ist mit $r = 0,8513$ geringer als die der beiden übrigen Methoden, und auch die Varianzanalyse ergibt einen Hinweis darauf, daß der Meßfehler sich nicht auf einen systematischen Einfluß von der ersten und zweiten Messung zurückführen läßt, d. h. also, die Reststreuung bei dieser Methode größer ist als bei den beiden übrigen Verfahren (Tabelle VI), sie ist aber immer noch signifikant geringer als die Varianz zwischen den Personen.

Art der Varianz	Anz.d.Freiheitsgrade	Summe der Abw.quadrate	mittleres Abw.quadrat	F	p
Zwischen Personen	26	543318,93	20896,88	12,45	0,01
Zwischen 1. und 2.Messg.	1	40,91	40,91	0,02	n.s.
Rest	26	43649,59	1678,83		
Total	53	587009,43			

Tabelle VI. Varianzanalyse für die Meßwiederholungen bei Hitzefibrinogen

- Zusammenfassend sind in Abbildung 11 die Mittelwerte der absoluten Differenzen mit der Standardabweichung des Mittelwertes dieser Differenzen vergleichend für die drei Methoden dargestellt und in Tabelle VII neben den zugehörigen Korrelationskoeffizienten wiedergegeben. Auch hier wird noch einmal deutlich, daß Hitzefibrinogen den größten Meßfehler aufweist, während der der modifizierten Bluret-Methode sogar noch unter dem des Kjeldahl-Verfahrens liegt (vergl. mittleres Abw.quadrat Rest in Tabellen IV, V und VI).

Methode	Korr.Koeff.r zw.1.u.2.Messg.	mittl.Abs.wertdiff.	Stand.abw.d. Mittelw. $s_{\bar{x}}$
Kjeldahl	0,9965	13,53	$\pm 2,58$
Bluret	0,9994	6,40	$\pm 0,76$
Hitze-fibrinogen	0,8513	40,33	$\pm 7,74$

Tabelle VII. Korrelationskoeffizient, mittlere Absolutwertdifferenz und Standardabweichung der Mittelwerte der Meßwiederholungen

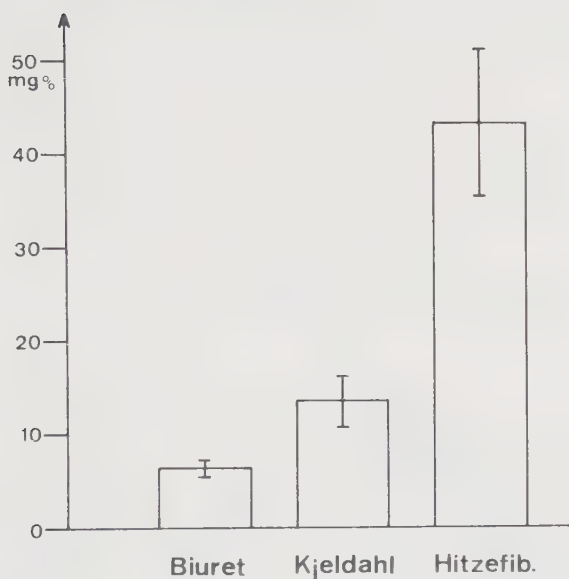


Abb. 11. Mittelwert der absoluten Differenzen zwischen den Doppelbestimmungen innerhalb jeder Methode mit Standardabweichung des Mittelwertes dieser Differenzen.

2. Vergleich der Methoden

- Kjeldahl-Biuret-Bestimmung

Zunächst wurde die Korrelation zwischen den an 40 Personen gewonnenen Messungen der Kjeldahl- und Biuret-Methode berechnet, wobei die aus der ersten und zweiten Messung gemittelten Werte in die Rechnung eingingen. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,9981$ und liegt damit ebenso hoch wie der der Kjeldahl-Doppelbestimmung. Das zugehörige Korrelationsdiagramm zeigt Abbildung 12. Die Regressionsgerade läuft fast genau durch den Nullpunkt und hat eine Steigung von fast 1, was die numerische Gleichheit der beiden Meßergebnisse dokumentiert.

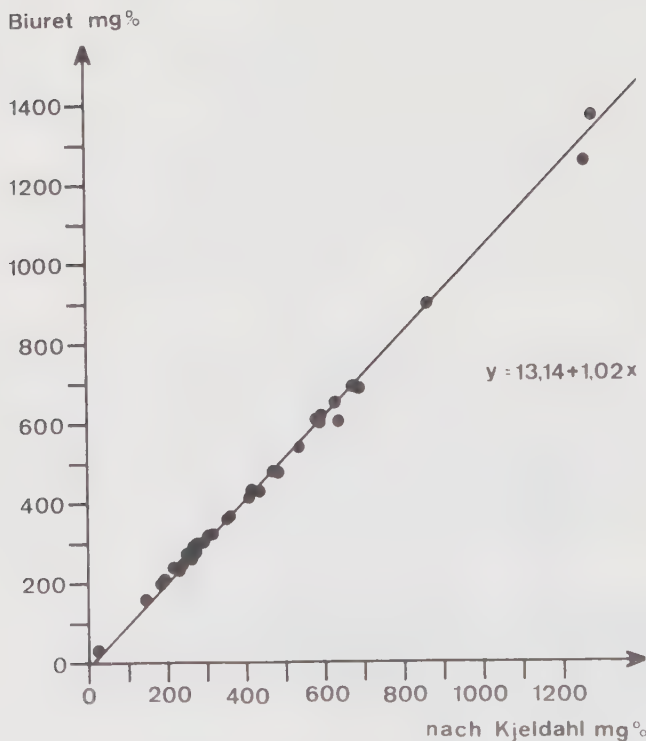


Abb. 12. Korrelationsdiagramm der Kjeldahl-Biuret-Bestimmung

Die Varianzanalyse (Tab. VIII) zeigt jedoch dank der sehr geringen Meßfehlerstreuung einen gewissen systematischen Unterschied zwischen den beiden Methoden an, wobei die Biuret-Werte jeweils höher liegen als die der Kjeldahl-Bestimmung ($\bar{x}_{\text{Kjeldahl}} = 427,9$; $\bar{x}_{\text{Biuret}} = 434,1$).

Art der Varianz	Anz.d.Freiheitsgrade	Summe der Abw.quadrate	mittleres Abw.quadrat	F	p
Zwischen Personen	39	5683887,49	145740,70	909,46	$\ll 0,001$
Zwischen Methoden	1	775,01	775,01	4,84	$\ll 0,050$
Rest	39	6240,49	160,01		
Total	79	5690902,99			

Tabelle VIII. Varianzanalyse für den Methodenvergleich Kjeldahl-Bluret

- Kjeldahl-Hitzefibrinogen-Bestimmung

Die Korrelation zwischen Hitzefibrinogen und Kjeldahl ist erheblich niedriger, $r = 0,4208$, obwohl dies auch bei 40 Fällen noch einen auf dem 1 % Niveau signifikanten Zusammenhang dokumentiert. Dies liegt einmal daran, daß die in diese Rechnung eingehenden Meßwerte nur Einzelbestimmungen waren und nicht die mit einer geringeren Streuung behafteten Mittelwerte aus je zwei Messungen wie bei dem Vergleich Bluret-Kjeldahl.

Wie das Korrelationsdiagramm, Abbildung 13, zeigt, ist dieses Ergebnis zum anderen vor allem durch die zwei Ausreißerwerte bedingt, die trotz hoher Kjeldahl-Werte relativ niedrige Hitzefibrinogenwerte haben. Die Korrelation ohne diese zwei Fälle beträgt $r = 0,76556$, was zwar noch nicht die Höhe des Zusammenhanges bei Kjeldahl und Bluret erreicht, aber doch eine erheblich deutlichere Übereinstimmung der Meßwertverteilung anzeigt.

Um weiter zu analysieren, ob diese geringere Korrelation dadurch bedingt ist, daß sich der Zusammenhang bei den höheren Kjeldahl-Werten verändert (vergl. Abb. 13), wurde die Korrelation getrennt für die Fälle mit Kjeldahl-Werten über und unter 400 mg% gerechnet. Dabei ergab sich bei den 28 Fällen mit niedrigen Kjeldahl-Werten eine Korrelation von $r = 0,72774$ und bei den 10 Fällen mit höheren Werten eine solche von $r = 0,37998$. Obwohl die Regressionsgerade in der zweiten Gruppe flacher ver-

läuft, ist die Korrelationsdifferenz nach dem z-Test jedoch nicht signifikant ($z = 1,275 < 1,96$), so daß also die Null-Hypothese nicht verworfen werden kann, daß diese beiden Kollektive derselben Grundgesamtheit entstammen.

Hitzeibrinogen mg %

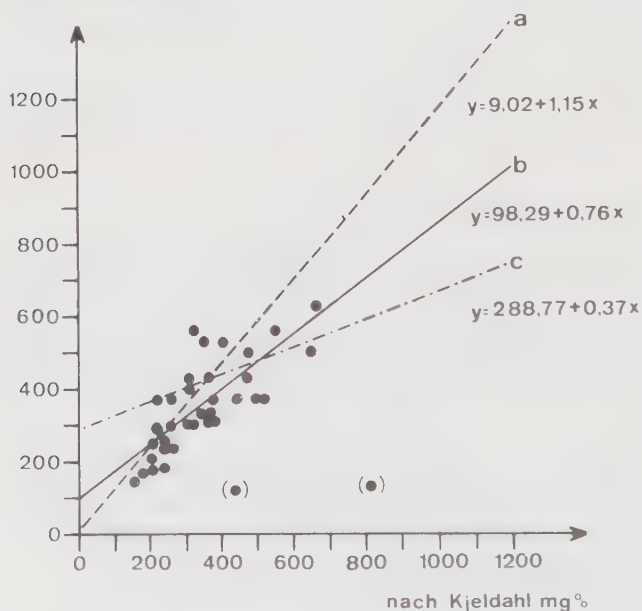


Abb. 13. Korrelationsdiagramm der Kjeldahl-Hitzeibrinogen-Bestimmung. Die Regressionsgeraden zur Schätzung von Hitzeibrinogen aus Kjeldahl wurden:

- für die Gesamtgruppe abzüglich der zwei Ausreißerfälle berechnet; $n = 38$
- für die Gruppe mit Kjeldahl-Werten < 400 mg%; $n = 28$
- für die Gruppe mit Kjeldahl-Werten > 400 mg%; $n = 10$

Die Korrelation zwischen den Kjeldahl- und den Hitzefibrinogenwerten, die in ccm abgelesen wurden (ohne Umrechnung in Kjeldahl-Werte), entspricht, ebenfalls ohne die zwei Ausreißerfälle berechnet, der, in die die Originalwerte eingehen ($r = 0,7673$) (Abb. 14).

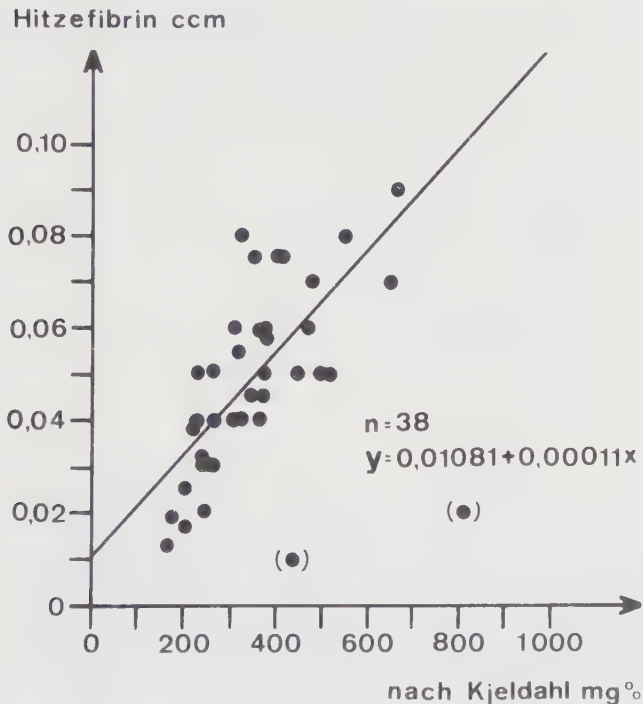


Abb. 14. Korrelationsdiagramm der Kjeldahl-Hitzefibrinogenbestimmung. (Hitzefibrinwerte in ccm)
Die Regressionsgerade zur Schätzung von Hitzefibrin aus Kjeldahl wurde für die Gesamtgruppe abzüglich der zwei Ausreißerfälle berechnet.

In der Varianzanalyse (Tabelle IX), in die auch die zwei Ausreißerfälle eingingen, dokumentiert sich die größere Streuung der Hitzefibrinogenwerte in der verhältnismäßig hohen Reststreuung, die zwar geringer

Ist als die zwischen den Personen, aber sehr viel größer als die Varianz, die auf die Meßmethode zurückgeht, so daß der F-Wert nicht signifikant ist, d. h., daß kein systematischer Unterschied zwischen den Ergebnissen der Bluret- und der Hitzefibrinogen-Methode vorliegt.

Art der Varianz	Anz. d. Freiheitsgrade	Summe der Abw. quadrate	mittleres Abw. quadrat	F	p
Zwischen Personen	30	1021117,55	26182,50	2,44	$< 0,01$
Zwischen Methoden	1	1960,20	1960,20	0,18	n. s.
Rest	30	417189,80	10112,56		
Total	70	1440867,55			

Tabelle IX. Varianzanalyse für den Methodenvergleich Kjeldahl-Hitzefibrinogen

- Bluret-Hitzefibrinogen-Bestimmung

Die Korrelation Bluret-Hitzefibrinogen ist $r = 0,8067$ (vergl. Abb. 15) und damit höher als die zwischen Kjeldahl und Hitzefibrinogen, was aber zum Teil durch die geringere Fallzahl begründet ist, die diesem Vergleich zugrundeliegt ($n = 27$). Die Differenz zu dem mit $n = 38$ gerechneten Korrelationskoeffizient zwischen Kjeldahl und Hitzefibrinogen ist nicht signifikant ($z = 0,429 < 1,96$). Die Tatsache, daß Bluret-Hitzefibrinogen einen aber doch in der Tendenz zuverlässigeren Zusammenhang aufweist als Kjeldahl-Hitzefibrinogen, liegt auch daran, daß hier im Gegensatz zum Vergleich Kjeldahl-Hitzefibrinogen wiederum mittlere Meßwerte statt Einzelmessungen in die Rechnung eingehen.

Auch hier wurde geprüft, ob sich die Relation der Hitzefibrinogenwerte zu den Bluretwerten in den höheren Bluret-Bereichen verändert. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten der Teilkollektive sind $r = 0,789$ für die Bluret-Werte unter 400 mg% ($n = 17$) und $r = 0,872$ für die Bluret-Werte über 400 mg% ($n = 10$). Obwohl auch hier die Steigung der Regressionsgeraden sich deutlich optisch unterscheidet, ist die Differenz der Korrelationskoeffizienten nicht signifikant ($z = 0,565 < 1,96$). In der

Varianzanalyse (Tab. X) läßt sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den Biuret- und Hitzefibrinogen-Messungen sichern.

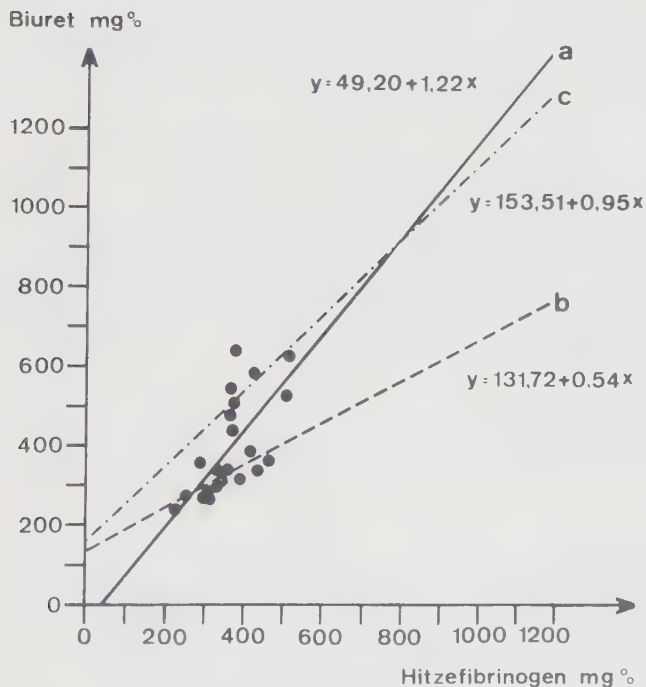


Abb. 15. Korrelationsdiagramm der Biuret-Hitzefibrinogen-Bestimmung. Die Regressionsgeraden zur Schätzung von Hitzefibrinogen aus Biuret wurden:

- a. für die Gesamtgruppe berechnet; $n = 27$
- b. für die Gruppe mit Biuret-Werten $< 400 \text{ mg\%}$; $n = 17$
- c. für die Gruppe mit Biuret-Werten $> 400 \text{ mg\%}$; $n = 10$

Art der Varianz	Anz.d.Freiheitsgrade	Summe der Abw.quadrate	mittleres Abw.quadrat	F	p
Zwischen Personen	26	769783,33	29607,05	6,79	<0,01
Zwischen Methoden	1	14145,85	14145,85	3,24	n.s.
Rest	26	113402,15	4361,62		
Total	53	897331,33			

Tabelle X. Varianzanalyse für den Methodenvergleich
Biuret-Hitzefibrinogen

- Zusammenfassend sind in Abbildung 16 noch einmal die Mittelwerte der bei den drei Methodenvergleichen erzielten Messungen dargestellt. Es wird deutlich, daß die größte Mittelwertdifferenz zwischen Biuret und Hitzefibrinogen vorliegt, sich die Methoden insgesamt gesehen aber nicht sehr voneinander unterscheiden.

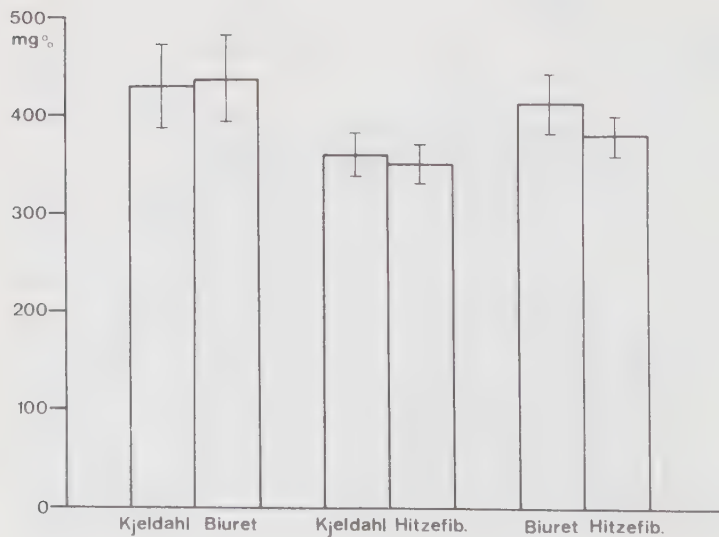


Abb. 16. Mittelwerte der Vergleichsmessungen der Methoden und Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes.

Außerdem wurde geprüft, ob das Geschlecht der Probanden oder die Art der Erkrankung einen Einfluß auf die Varianz der Meßwerte haben. Dafür wurde zunächst für jedes Verfahren der t-Test unter Verwendung der Mittelwerte der 1. und 2. Messung zum Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Personen durchgeführt. Geschlechtsunterschiede (vergl. Tab. XI) konnten nicht festgestellt werden. Aber der Vergleich der Hodgkin-Fälle mit den gesunden Personen ergab einen signifikanten Unterschied für alle drei Verfahren (vergl. Tab. XII), wobei die Hodgkin-Fälle deutlich höher lagen.

Methode	männlich			weiblich			t	p
	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n		
Kjeldahl	465,75	256,60	19	393,66	277,48	21	0,855	n.s.
Biuret	474,45	220,26	33	375,35	234,79	34	1,791	n.s.
Hitze-fibrinogen	408,71	119,76	14	342,92	67,19	13	1,749	n.s.

Tabelle XI. Vergleich der männlichen und weiblichen Gruppe; Mittelwerte der 1. und 2. Messung der drei Methoden.

Methode	M. Hodgkin			Gesunde			t	p
	$\bar{x}$	s	n	$\bar{x}$	s	n		
Kjeldahl	570,06	218,23	15	274,69	26,83	13	4,863	$< t_{0,001;26}$
Biuret	551,92	192,55	26	288,19	192,55	26	6,919	$< t_{0,001;50}$
Hitze-fibrinogen	443,36	117,28	11	319,69	57,02	13	3,388	$< t_{0,001;22}$

Tabelle XII. Vergleich der Hodgkin-Fälle mit Gesunden; Mittelwerte der 1. und 2. Messung der drei Methoden.

IV. DISKUSSION

Der Vergleich der Bestimmungswerte der Kjeldahl- mit der Bluret-Methode hat eine gute Übereinstimmung gebracht, die den Vergleichsergebnissen von H i r s c h und C a t t a n e o (56) - Methode nach Mizuta mit 0,5 ml Plasmaansatz - gleichkommt. Das Ergebnis ist auch vergleichbar mit den Untersuchungen von E s s e r und H e i n z l e r (32), wenn auch dort die Bluret-Werte mit der gravimetrischen Methode verglichen wurden. Auch bei den genannten Autoren ist der systematische Unterschied der beiden Methoden mit einer geringgradigen Erhöhung der Bluret-Werte festzustellen. Auf dieses Phänomen ist grundsätzlich auch beim Vergleich der beiden Methoden innerhalb der Albumin-, Globulin- und Gesamteiweiß-Messung hingewiesen worden (55, 69, 108). Der Unterschied beruht auf der Bestimmung unter Zugrundelegung verschiedener Proteinmerkmale.

Die Skala der Werte reichte von 22 bzw. 24 mg% (Dysfibrinogenämie) bis 1276 bzw. 1362 mg% (Nephrose), wobei sich bei diesen extrem hohen Werten größere Unterschiede zwischen den beiden Methoden zeigten. Diese dürften mit einer erhöhten Streuung statistisch erklärbar sein. Die geringe Erhöhung des Bluret-Wertes könnte neben den diskutierten systematischen Einflüssen bei den niedrigsten Bestimmungswerten durch Schmutztrübung im Bluret-Reaktionsansatz hervorgerufen sein. Eine Zentrifugation des Ansatzes vor der photometrischen Messung erscheint deswegen nicht notwendig, solange auf peinliche Sauberkeit geachtet wird. Wichtiger ist in diesem Zusammenhang eine vorherige Prüfung der Einmal-Plastikküvetten, die oft durch Verkratzungen eine höhere Lichtabsorption bedingen und damit eine höhere Konzentration vortäuschen.

Der Vorteil einer geringeren notwendigen Plasmamenge zur modifizierten Mikromethode wird dadurch geschmälert, daß Gerinnsel aus Plasma mit extrem niedrigem Fibrinogenspiegel makroskopisch nicht mehr zu erkennen sind und bei der Waschprozedur nicht mehr beobachtet werden können, während die Gerinnsel von 1 ml Plasma fünfmal größer sind. Der hier bestimmte niedrigste Wert lag bei 20 mg%; Plasma mit niedrigerem Fibrinogengehalt stand nicht zur Verfügung.

Die geringere Plasmaverdünnung der Bluret-Methode (10fach) gegenüber der Kjeldahl-Methode (30fach) und die Verwendung von Thrombin ohne entsprechende Pufferlösung (im Gegensatz zu M o r r i s o n (85))

brachten beim Vergleich der Bestimmungswerte keine unterschiedlichen Ergebnisse.

In welcher Höhe möglicherweise andere Proteine in dem Fibrinogen-Niederschlag eingeschlossen und damit bestimmt wurden, läßt sich nicht feststellen. Morrison (85) hat diese Fehlermöglichkeit durch Mitäusschütteln von Albumin für unbedeutend gehalten, eine mögliche Ausschüttung von 10 - 25 % Lipoproteinen aber für möglich erachtet bei lipoproteinreichem Plasma. Jacobson (64) hingegen ist der Meinung, daß nur denaturierte Lipoproteine eingeschlossen würden; eine Feststellung, die bei der Hitzefibrinogenbestimmung zu berücksichtigen wäre. Inwieweit die Fibrinogenmessung bei dem Patienten mit essentieller Hyperlipämie (Kjeldahl-Wert 266 mg%, Hitzefibrin-Wert 370 mg%) diese Aussage stützt, ist bei nur einem Fall schwer zu sagen.

Neben dem lipämischen Plasma ist der Einfluß von hämolytischem und icterischem Plasma bei der Fibrinogen-Bluret-Bestimmung durch den Ausgang vom Gerinnel sich freilich wesentlich geringer als bei den Serum-Bluret-Bestimmungen. Die wenigen Fälle mit icterischem Plasma unter den Lebererkrankungen zeigten bei den zwei Bestimmungsmethoden nach Kjeldahl und Bluret keinen wesentlichen Unterschied, so daß innerhalb der Arbeit keine Aussage darüber gemacht werden kann. Nach Goodwin (44) interferieren Bilirubin-Konzentrationen erst ab 32 mg% und sind nach Vorbehandlung des Plasmas mit NaOCl zu vermeiden; Hämoglobin mache sich bei Konzentrationen über 400 mg% gering bemerkbar, könne aber ausgewaschen werden. Bei der hier beschriebenen modifizierten Bluret-Methode dürfte der Einfluß noch geringer sein, da Goodwin (43,44) mit dem empfindlicheren Benedict's-Reagens bei 320 m μ arbeitete.

Zusammenfassend soll hier lediglich auf eine kritische Bewertung derartig veränderter Plasmen hingewiesen werden, oder eine entsprechende Verarbeitung vorgenommen werden.

Der Vergleich zwischen der Kjeldahl- und Bluret-Methode zeigt außerdem, daß die Empfindlichkeit des Bluret-Reagens nach Weichselbaum, bei 546 m μ gemessen, in Kombination mit der Gesamteiweißbestimmung im Rahmen der Routinediagnostik ausreichend ist. Zu ähnlichem Ergebnis kommen auch Reiner und Cheung (104), die beim Fibrinogenbestimmungsvergleich zwischen gewöhnlichem Bluret-Reagens

und dem hochempfindlichen Phenol-Bluret-Reagens nach Lowry das letztgenannte Reagens der Messung kleiner Fibrinogenmengen vorbehalten.

Analysenfehler, die hauptsächlich aus Pipettier- und Gerätefehlern entstehen, sind methodenspezifisch und lassen sich durch die Unterschiede innerhalb der Doppelbestimmungen erkennen. Die höhere Korrelation der Bluret- gegenüber den Kjeldahl-Wiederholungsbestimmungen ist wohl zurückzuführen auf die Verwendung von Dosimeter, Einmal-Küvetten sowie Konstriktionspipetten anstelle von Stangenpipetten; außerdem haften den vielen Arbeitsschritten der Kjeldahl-Methode eine größere experimentelle Fehlerbreite an.

Damit wird zugleich das Zeitproblem angesprochen. Zur Durchführung der Kjeldahl-Methode, beginnend nach der Blutentnahme, wurden abhängig von der Zahl der Bestimmungen mindestens 2 h 45 min. benötigt; die Bluret-Methode, deren Bestimmungszahl praktisch unbegrenzt ist, dauerte höchstens 1 h 10 min. Sie lag damit über dem Zeitbedarf der Hitzefibrinogen-Methode nach Schulz, die nur 30 min. benötigte.

Der Zeitvorteil und der geringe technische Aufwand der Hitzefibrinogen-Methode werden geschmälert durch das Ergebnis der vergleichenden Einfachbestimmungen mit der Kjeldahl-Methode. Die graphische Darstellung, Abb. 13, ergibt zwar eine gerichtete Punkteschar, ist aber weit von der fast identischen Übereinstimmung der Kjeldahl-/Bluret-Werte entfernt. Die beiden weit außerhalb liegenden Werte dürften auf einen Zufallsfehler beim Ablesen oder beim Eintragen des Hitzefibrinwertes zurückzuführen sein und wurden nicht berücksichtigt.

Inwieweit sich bei diesem Vergleich der bereits auf Kjeldahl-Werte umgerechnete Hitzefibrinogenwert auswirkte, wurde in der nachfolgenden Darstellung, Abb. 14, untersucht, in der die am Nisselröhrchen direkt abgelesenen Hitzefibrinwerte in ccm gegen die Kjeldahl-Vergleichsmessungen abgetragen wurden. Obwohl sich rechnerisch kein Unterschied zwischen den Regressionsgeraden der 38 Werte ergab, zeigt der Vergleich der Darstellung Abbildung 14 mit Abbildung 13 graphisch ein Zusammenrücken der Werte und kommt damit der "gerichteten Punktwolke" mit der gleichen Meßeinteilung von Schulz (120) nahe. Auch dort haben die höheren Werte eine größere Streuung als die zwischen 100 und 400 mg%.

Nach S c h u l z (120) "beeinträchtigt die größere Streuung bei den hohen Werten in keiner Weise den differentialdiagnostischen Wert einer Hitzefibrinbestimmung". Deshalb erscheint es besser - wie bereits in der Methodenbeschreibung erwähnt -, bei der halbquantitativen Aussage von S c h u l z (120) innerhalb der ccm-Einteilung des Nisselröhrchens von einem erniedrigten, erhöhten und normalen Fibrinogenspiegel zu sprechen.

Auch die 27 Doppelbestimmungen der mit der Kjeldahl-Methode gut übereinstimmenden Bluret-Methode, im Vergleich mit der Hitzefibrin-Methode, - die Korrelation Ihrer Mittelwerte ist in Abbildung 14 dargestellt - zeigen zwar eine wesentlich geringere Streuung gegenüber dem Kjeldahl-Hitzefibrin-Vergleich; diese ist aber noch deutlich vorhanden.

Eine Erklärung dafür ist schwer zu finden, zumal bei der Hitzeausfällungstechnik mit nachfolgender Bluretbestimmung kaum ein Unterschied zu anderen Isolierungstechniken festgestellt werden konnte (31, 43) und S c h u l z (120) im Hitzefibrin den gleichen N-Gehalt wie in dem Fibringerinnsel aus recalcifiziertem Oxalatplasma gefunden hat. Die Identität des bei 56° C ausgefällten Hitzefibrins mit dem durch Recalcifikation gewonnenen Fibrin ist dennoch fraglich; - S c h u l z (120) spricht hier vorsichtig von einer "sehr großen chemischen und physiologischen Ähnlichkeit". Unbeantwortet muß bleiben, inwieweit die an dieser Stelle einsetzende Kritik in der Literatur (26, 27, 28) zu Recht besteht, die bei dieser Temperatur eine unvollständige Hitzefibrinausfällung bzw. Mitausfällung anderer Plasmaproteine, selten auch Pyroglobuline (43), annimmt. Sicher weicht das Hitzefibrin ebenso wie die Fibrinsalzausfällung von dem physiologisch durch Gerinnung umgewandelten Fibrinogen in Fibrin, der Arbeitsgrundlage der Kjeldahl- und Bluret-Methode, ab (Definition des Fibrins nach S t a r l i n g e r (124)).

Bei der Diskussion der klinisch-diagnostischen Aussage der drei Fibrinogenbestimmungsmethoden ist die Festlegung des Normalbereiches entscheidend. Die Untersuchung von insgesamt 21 weiblichen und 9 männlichen gesunden Personen verschiedenen Alters reicht für einen repräsentativen Normalbereich innerhalb der jeweiligen Methode nicht aus. In der Literatur ist der Normalwertbereich verschiedener Methoden (8, 103, 104, 113) und auch gesondert, vor allem bezüglich des Geschlechtsunterschiedes und der Altersabhängigkeit, ausreichend diskutiert worden (11, 28, 93, 98, 106, 117, 119).

H e n r y (55) hat die Ergebnisse unabhängig von Geschlecht und Alter zusammengefaßt und einen Normalwert von $0,20 - 0,40 \text{ g/100 ml}$ mit einem Mittelwert von $0,28 \text{ g/100 ml}$ angegeben. Der Mittelwert der 26 gesunden Personen, deren Plasma nach der durchgeführten Biuret-Methode bestimmt wurde, beträgt $\bar{X} = 288,19 \text{ mg\%}$ und ist mit dem von $295 \text{ mg\%}$ aus 20 Normalpersonen aus der Biuret-Methode von R e i n e r und C h e u n g (104) vergleichbar. Der Mittelwert der 13 Normalpersonen liegt bei der Kjeldahl-Methode, entsprechend dem Gesamtmittelwert, unter dem Biuret-Mittelwert mit $\bar{X} = 274,69 \text{ mg\%}$. Bei der Hitzefibrinogenbestimmung liegt der Mittelwert von 13 Normalpersonen bei $\bar{X} = 319 \text{ mg\%} \pm 0,0428 \text{ ccm}$. Legt man den auch bei der Kjeldahl-Methode angegebenen Normalbereich von $200 - 400 \text{ mg\%}$ zugrunde, liegen die nach dieser Methode bestimmten Werte der gesunden Personen ausschließlich innerhalb dieser Grenzen; das gleiche gilt für die Biuret-Methode, bei der aufgrund der guten Übereinstimmung mit der Kjeldahl-Methode der gleiche Normalbereich angenommen werden konnte. Der Normalbereich zwischen $0,04$ und $0,07 \text{ ccm}$ Hitzefibrin wurde bei Normalpersonen lediglich von einem Wert überschritten.

Bei den 20 verschiedenen Diagnosen innerhalb der 107 untersuchten Personen, bei denen es sich hauptsächlich um hämatologische Fälle handelt, ergeben sich zum größten Teil ähnliche Fibrinogenwertbereiche wie bei den Untersuchungen von S c h u l z (119). Die geringe Fallzahl innerhalb einer Diagnose läßt größere Aussagen nicht zu; deshalb sei hier nur verwiesen auf die niedrigen Fibrinogenwerte der Lebererkrankungen, die mehr oder weniger unspezifischen Werte um und im Normalbereich der hämatologischen Erkrankungen, die erhöhten Werte der Malignome (107) und die extrem hohen Werte der Nephrosen.

Die 39 an M. Hodgkin erkrankten Personen erlauben eine Gegenüberstellung mit den 30 Normalpersonen. Die Fibrinogen-Mittelwerte der Patienten mit M. Hodgkin liegen bei allen drei Methoden wesentlich über denen der Normalpersonen (vergl. Tab. XII). Die zufällig gleiche Anzahl der 26 Fälle innerhalb der Biuret-Methode läßt einen exakten Vergleich mit $551,92 \text{ mg\%}$ der an M. Hodgkin erkrankten und mit $288,19 \text{ mg\%}$ der gesunden Personen zu. Bei der Beurteilung der einzelnen Fälle hatten die akuten, neu stationär aufgenommenen M. Hodgkin-Kranken eine hochgradige Hyperfibrinogenämie weit über $400 \text{ mg\%}$,

während die ambulanten Patienten mit diesem Krankheitsbild - offensichtlich in der Remission - normale Werte im Bereich von 300 - 400 mg% aufwiesen.

S c h u l z (120) hat auf die hohen Fibrinogenwerte bei M. Hodgkin hingewiesen und auch ein Absinken der Werte nach entsprechender Behandlung beobachtet. Heute wird die laufende Kontrolle der Fibrinogenwerte bei der Behandlung des M. Hodgkin notwendig empfunden, um eine optimale Überwachung der zytostatischen Behandlung zu erreichen (111).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Übersicht über die wichtigsten Fibrinogenbestimmungen wurden die colorimetrische Methode über die Bildung des Bluret-Komplexes mit dem Bluret-Reagens nach Weichselbaum und die Hitzefibrin-Bestimmung nach Schulz mit der Standard-Bestimmungstechnik über den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl und untereinander unter dem Gesichtspunkt der Routinediagnostik verglichen. Dabei wurden die Fibrinogenwerte von 107 gesunden und kranken Personen beiderlei Geschlechts und unterschiedlichen Alters zum größten Teil durch Doppelbestimmungen mit je zwei verschiedenen Methoden ermittelt.

Die statistische Auswertung ergab eine gute Übereinstimmung zwischen der Kjeldahl- und der modifizierten Bluret-Methode in bezug auf die Genauigkeit der Werte.

Die Einführung dieser Bluret-Fibrinogenbestimmung in das automatische Laborprogramm mit dem "Calculating Absorptiometer" erlaubt eine einfachere und schnellere Durchführung und ließ diese Methode zur Verwendung in der Routinediagnostik brauchbarer erscheinen. Die Anpassung dieser Fibrinogenmessung an die Bluret-Gesamteiweißbestimmung stellt eine weitere labortechnische Rationalisierung dar.

Als relativ schnelle Methode mit genauen Werten auch unter 100 mg% ist dieses modifizierte Bluret-Verfahren zur Fibrinogenbestimmung indiziert bei Verdacht auf Hyperfibrinogenämie, im Verlauf von intravasculärem Gerinnungsprozeß, Defibrinierungssyndrom und Hyperfibrinolyse, sowie bei der Aufstellung eines Gerinnungsstatus und ist neben der BSG eine wichtige diagnostische und prognostische Aussage bei zahlreichen Krankheiten.

Die Hitzefibrinogen-Methode nach Schulz erlaubt, halbquantitativ von erniedrigten, erhöhten und normalen Fibrinogenwerten zu sprechen. Diese Schnellmethode ist als grobe Vororientierung - besonders bei akutem Fibrinogenmangel - gut geeignet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Antonaci, B. L., I. Del Giovane und G. Macagnino:
Dasaggio del fibrinogeno mediante
elettroforesi su carta.
Diagnosi 14, 429 (1958)
2. Antonini, F. M. und G. Piva:
La determinazione quantitativa del fibrinogeno
con l'elettroforesi su carta.
Sperimentale 103, 324 (1953)
3. Ardry, R.: Estimation et dosage différentiel des
protéines sanguines.
Ann. Biol. clin. 7, 407 (1949)
4. Ardry, R.: Microdétermination rapide du fibrinogène
plasmatique.
Ann. Biol. clin. 18, 485 (1960)
5. Astrup, T., P. Brakman und U. Nissen:
The estimation of fibrinogen. A revision.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 17, 57 (1965)
6. Atencio, A. C., D. C. Burdick und E. B. Reeve:
An accurate isotope dilution method for
measuring plasma fibrinogen.
J. Lab. clin. Med. 66, 137 (1965)
7. Audiffren, P.:
Choix de l'anticoagulant pour le prélève-
ment de sang en vue de la détermination
de la fibrinémie.
Médecine Tropicale 20, 618 (1960)
8. Bang, H. O.:
Quantitative determination of fibrinogen
in plasma. - Gram's Method modified.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 9, 205 (1957)
9. Barbagallo-Sangiorgi, G. und A. Caputo:
La determinazione elettroforetica del
fibrinogeno della cirrosi epatica ed
in altre condizioni morbose.
Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 29, 827 (1953)
10. Baumann, J.:
Methodisches zur Fibrinogenbestimmung.
Z. ges. exp. Med. 68, 707 (1929)

11. Beller, F. K.:
Die Gerinnungsverhältnisse bei der
Schwangeren und beim Neugeborenen.
Leipzig 1957
12. Berkeš, I., P. Berkeš-Tomasevič und M. Kalpakdžijan
Fibrinogenbestimmung mittels Papier-
elektrophorese. II. Mitteilung:
Quantitative Auswertung.
Schweiz. med. Wschr. 32, 909 (1956)
13. Bezançon, F., M. P. Weil und C. O. Guillaumin:
Le sang dans le rhumatisme articulaire aigu.
Ann. Méd. 19, 202 (1926)
14. Bonsnes, R. W. und W. J. Sweeney:
A rapid, simple semi-quantitative test
for fibrinogen employing thrombin.
Amer. J. Obst. Gynec. 70, 332 (1955)
15. Bowman, H. S. und M. B. Yellito:
A method for determining the plasma
fibrinogen titer.
Amer. J. Obst. Gynec. 74, 670 (1957)
16. Brackenridge, C. J.:
The interaction of plasma fibrinogen
with anticoagulants in vitro.
Clin. chim. Acta 5, 552 (1960)
17. Brand, E., B. Kassell und L. J. Saidel:
Amino acid composition of plasma proteins.
J. Clin. Invest. 23, 437 (1944)
18. Calman, R. M. und P. C. Cole:
Rapid estimation of fibrinogen in
obstetric cases.
Brit. med. J. 2, 1933 (1960)
19. Campbell, W. R. und M. I. Hanna:
The albumin, globulins and fibrinogen
of serum and plasma.
J. Biol. Chem. 119, 15 (1937)
20. Camponovo, P. und A. Mariani:
Rev. Asoc. bioquím. Arg. 15, 368 (1951)
zit. in Hirsch, A. und C. Cattaneo:
Vergleichende Untersuchung der
modernen quantitativen Plasma-
Fibrinogen-Bestimmungsmethoden.

21. Christensen, L. K.:
A method for determination of
fibrin in plasma.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 246 (1955)
22. Clarke, H. G. M. und T. Freeman:
A quantitative immunoelectrophoretic method.
In: Peeters, H.: Proc. 14th Colloqu. Protides
of the biological fluids, Brügge 1966.
23. Clauss, A.:
Gerinnungsphysiologische Schnellmethode
zur Bestimmung des Fibrinogens.
Acta haemat. (Basel) 17, 237 (1957)
24. Cullen, G. E. und D. D. van Slyke:
Determination of the fibrin, globulin and
albumin nitrogen of blood plasma.
J. biol. Chem. 41, 587 (1920)
25. Delory, G. E.:
Photoelectric methods in clinical
biochemistry.
London 1949
26. Deutsch, E. und G. Geyer:
Laboratoriumsdiagnostik. Normalwerte
und Interpretation.
Berlin 1969
27. Dittrich, H., E. Puffer und E. Seifert:
Experimentelle Untersuchungen über die
Bestimmung des Hitzefibrins nach Schulz.
Klin. Wschr. 37, 465 (1959)
28. Dittrich, H., E. Puffer und E. Seifert:
Klinische Untersuchungen über die
Hitzefibrinbestimmung nach Schulz.
Medizinische 25, 1202 (1959)
29. Dubreuil: Contribution à l'étude des protéines
dans le rhumatisme chronique.
Thèse de Pharmacie, Lyon 1939
30. Ebbecke, U. und F. Knüchel:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 243, 54 (1939)
zit. In: Knüchel F. und I. Ganter:
Eine Methode zur gleichzeitigen Bestimmung
des Gerinnungsablaufes und des Fibrinogens.
Klin. Wschr. 26, 557 (1948)

31. Ellis, B. C. und A. Stransky:
A quick and accurate method for the
determination of fibrinogen in plasma.
J. Lab. clin. Med. 58, 477 (1961)
32. Esser, H. und F. Heinzler:
Eine colorimetrische Fibrinogenbe-
stimmung mit der Biuret-Reaktion.
Klin. Wschr. 30, 991 (1952)
33. Favre-Gilly, J., J. P. Thouverez und J. Belleville:
Les techniques courantes de dosage du
fibrinogène et de la fibrine.
Nouv. Rev. franc. Hémat. 5, 335 (1965)
34. Fearnley, G. R.:
An accurate method of fibrin recovery for
the determination of plasma-fibrinogen.
Lancet II, 501 (1951)
35. Ferry, J. D. und P. R. Morrison:
Preparation and properties of serum and
plasma proteins. VIII. The conversion
of human fibrinogen to fibrin under
various conditions.
J. Amer. chem. Soc. 69, 388 (1947)
36. Folin, O. und V. Cocalteu:
Oxytisine and tryptophane determining
in proteins.
J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)
37. Foster, D. P. und G. H. Whipple:
Blood fibrin studies. I. An accurate
method for the quantitative analysis
of blood fibrin in small amounts of blood.
Amer. J. Physiol. 58, 365 (1922)
38. Fowell, A. H.:
Turbidimetric method of fibrinogen assay.
Amer. J. clin. Path. 25, 340 (1955)
39. Gadboys, H. L., I. Nolan und I. C. Davila:
The effect of mechanical trauma on
fibrinogen in heparinized blood.
Ann. Surg. 151, 399 (1960)
40. Gerok, W.: Eine Methode zur Mikrobestimmung der
Fibrinogenkonzentration im Blutplasma.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 291, 129 (1952)

41. Goa, J.: A micro biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 5, 218 (1953)
42. Goodwin, J. F.: Estimation of plasma fibrinogen using sodium sulfite fractionation.
Amer. J. clin. Path. 35, 227 (1961)
43. Goodwin, J. F.: An evaluation of technics for the separation and estimation of plasma fibrinogen.
Clin. Chem. 11, 63 (1965)
44. Goodwin, J. F.: Microestimation of fibrinogen with a semimicro modification applicable to icteric plasma.
Clin. Chem. 13, 947 (1967)
45. Goodwin, J. F.: An evaluation of turbidimetric technics for estimation of plasma fibrinogen.
Clin. Chem. 13, 1057 (1967)
46. Gornall, A. G., C. J. Bardawill und M. M. David: J. biol. Chem. 177, 751 (1949)
zit. In: Henry, R. J.: Clinical Chemistry. Principles and Technics. New York 1966
und In Gleiss, J. und K. Hinsberg: Zur fraktionierten colorimetrischen Bestimmung der Serumproteine im klinischen Laboratorium. Z. exp. Med. 116, 599 (1951)
47. Gräf, W. und K. H. Kimbel: Eine neue Fibrinogenbestimmung durch Invertsefentitration.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 304, 273 (1956)
48. Gram, H. C.: A new method for the determination of the fibrin percentage in blood and plasma.
J. biol. Chem. 49, 279 (1921)
49. Gross, R., G. Schwick, N. Lang, D. Nies, B. Rahn, M. Becker und H. Hengstmann: Untersuchungen an einer angeborenen Afibrinogenämie.
Klin. Wschr. 41, 695 (1963)

50. Gugler, E., H. Stillhart, N. Burger und R. Bütler:
Die kongenitale Afibrinogenämie.
Schweiz. med. Wschr. 94, 1469 (1964)
51. Halse, T.: Colorimetrische Methode zur quantitativen
Bestimmung der Fibrinolyse für klinische
Serienuntersuchungen.
Klin. Wschr. 27, 226 (1949)
52. Hammarsten, O.:
Pflügers Arch. ges. Physiol. 19, 563 (1879)
zit. In: Deutsch, E.: Blutgerinnungs-
faktoren, Bd. 1, S. 147, Wien 1955
53. Haupt, H., M. Beseke und H. v. Zimmermann:
Untersuchungsgang zur Differenzierung von
Blutungsübeln der Neugeburtperiode.
Klin. Wschr. 37, 220 (1959)
54. Hennig, N.:
Klinische Laboratoriumsdiagnostik.
München 1966
55. Henry, R. J.:
Clinical Chemistry. Principles and Technics.
New York 1966
56. Hirsch, A. und C. Cattaneo:
The quantitative determination of plasma
fibrinogen through the electrophoresis of
blood plasma on filterpaper.
Arch. Biochem. 61, 27 (1956)
57. Hirsch, A. und C. Cattaneo:
Vergleichende Untersuchung der modernen
quantitativen Plasma-Fibrinogen-Bestim-
mungsmethoden.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 304, 53 (1956)
58. Holzknecht, F.:
Die Verbrauchskoagulopathie.
Dtsch. med. Wschr. 95, 1275 (1970)
59. Howe, P. E.:
The determination of proteins in
blood - a micro method.
J. biol. Chem. 49, 109 (1921)
60. Howe, P. E.:
The determination of fibrinogen by pre-
cipitation with sodium sulfate compared
with the precipitation of fibrin by the
addition of calcium chloride.
J. biol. Chem. 57, 235 (1923)

61. Ilca, S., D. Constantiu und Z. Ioanovicl:
Einfache Fibrinogenbestimmungsmethode.
Z. ges. Inn. Med. 18, 380 (1963)
62. Ingram, G. I. C.:
The determination of plasma fibrinogen
by the clot-weight method.
Biochem. J. 51, 583 (1952)
- 63.- Ingram, G. I. C. und M. O. Matchett:
A rapid "slide room" method for the
determination of plasma fibrinogen
concentration as fibrin.
J. clin. Path. 13, 469 (1960)
64. Jacobsson, K.:
Studies on the determination of
fibrinogen in human blood plasma.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7,
Suppl. 14, 7 (1955)
65. Jacox, R. F.:
A new method for analysis of plasma
fibrinogen utilizing a cationic
detergent.
J. Lab. clin. Med. 44, 885 (1954)
66. Jones, T. P. und P. H. Smith:
Blood fibrinogen level in hepatectomized
dogs and an outline of method for
quantitative determination of fibrinogen.
Amer. J. Physiol. 94, 144 (1930)
67. Jürgens, J. und F. K. Beller:
Klinische Methoden der Blutgerinnungs-
analyse.
Stuttgart 1959
68. Kautzsch, E. und A. Rauscher:
Colorimetrische Fibrinolysebestimmung
mittels des Tyrosinäquivalentes.
Klin. Wschr. 28, 649 (1950)
69. Kingsley, G. R.:
The direct biuret method for the deter-
mination of serum proteins as applied
to photoelectric and visual colorimetry.
J. Lab. clin. Med. 27, 840 (1942)
70. Klinke, K. und G. Elias:
Gerinnungsstudien. IV. Mitteilung:
Kenetische Untersuchungen der Fibrin-
ogengerinnung.
Z. ges. exp. Med. 77, 717 (1913)

71. Koch, F. C. und T. L. McMeekin:
A new direct nesslerization micro-
Kjeldahl-method and a modification
of the Nessler-Folin-reagent for
ammonia.
J. Amer. Chem. Soc. 461, 2066 (1924)
72. Lasch, H. G. und D. Heene:
Methoden zur Untersuchung des Blut-
gerinnungs- und Fibrinolyse-systemes.
Internist (Berl.) 9, 42 (1968)
73. Laurell, C. B.:
Remarks on the centrifugal force
necessary for separation of plasma
for fibrinogen determination.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 95 (1955)
74. Leclerc, M. und A. Khodabaudeh:
Microméthode de dosage du fibrinogène
plasmatique.
Ann. Biol. clin. 10, 596 (1953)
75. Lienert, G. A.:
Testaufbau und Testanalyse.
Weinheim/Bergstraße 1961
76. Losner, S., B. W. Volk, M. Jacobl und S. Newhouse:
Spectrophotometric studies on clot
density.
J. Lab. clin. Med. 38, 28 (1951)
77. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr
und R. J. Randall:
Protein measurement with the
Folin-Phenol-reagent.
J. biol. Chem. 193, 265 (1951)
78. Marenzi, A. D. und C. J. Gomez:
Publ. Cent. Invest. fisiol. (B. Aires) 15,
293 (1951)
zit. in: Favre-Gilly, J., J. P. Thouverez
und J. Belleville: Les techniques courantes
de dosage du fibrinogène et de la fibrine.
Nouv. Rev. franc. Hémat. 5, 335 (1965)
und in: Hirsch, A. und C. Cattaneo:
Vergleichende Untersuchung der modernen
quantitativen Plasma-Fibrinogen-Bestim-
mungsmethoden.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 304, 53 (1956)

79. Marner, I. C.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7,
Suppl. 21 (1955)
zit. In: Henry, R. J.: Clinical Chemistry.
Principles and Technics. New York 1966
80. Martinek, R. G. und R. E. Berry:
Micromethod for the estimation of
plasma fibrinogen.
Clin. Chem. 11, 10 (1965)
81. Marx, R.: Hämostaseologische Analysen (Ge-
rinnungs- und Fibrinolyseteste)
In der derzeitigen Herztherapie.
Ärztl. Lab. 10, 254 (1964)
82. Mehl, J. W.:
The biuret reaction of proteins in
the presence of ethylene glycol.
J. biol. Chem. 157, 173 (1945)
83. Meunier, P. und A. Dreyfuss:
Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 22,
529 (1940)
zit. In: Deutsch, E.: Blutgerinnungs-
faktoren, Bd. 1, Wien 1955
84. Mizuta, W.:
Igaku to Seibutsugaku (Medicine and
Biology) 29, 11 (1953)
zit. In: Hirsch, A. und C. Cattaneo:
Vergleichende Untersuchung der mo-
dernen quantitativen Plasma-Fibrino-
gen-Bestimmungsmethoden.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 304, 53 (1956)
85. Morrison, P. R.:
Preparation and properties of serum
and plasma proteins. XV. Some factors
influencing the quantitative deter-
mination of fibrinogen.
J. Amer. chem. Soc. 69, 2723 (1947)
86. Müller-Siefert:
Taschenbuch der medizinisch-klinischen
Diagnostik. 69. Aufl. Hrsg. v. H. v. Kress,
München 1966
87. Mylon, E., M. J. Winternitz und G. J. de Sütö-Nagy:
The identification of fibrinogen with protamine.
J. Biol. Chem. 143, 21 (1942)

88. Nilsson, I. M. und B. Olow:
Determination of fibrinogen and
fibrinogenolytic activity.
Thrombos. Diathes. haemorrh. 8, 297 (1962)
89. Nygaard, K. K., R. Gathe und T. Guthe:
Quantitative determination of blood
fibrin by means of photoelectric
principle.
Scand. Arch. Physiol. 83, 195 (1940)
90. Ohler, W. G. A., J. Fischer, W. Enders und
B. Kikillus:
Hypofibrinogenämische hämorrhagische
Diathese bei Prostatakarzinom.
Dtsch. med. Wschr. 91, 119 (1966)
91. Parfentjev, I. A., M.-L. Johnson und E. E. Clifton:
The determination of plasma fibrinogen
by turbidity with ammonium sulfate.
Arch. Biochem. 46, 470 (1953)
92. Perkins, H. A. und M. R. Rolfs:
Quantitative assay of fibrinogen and
fibrinolytic activity.
Blood 22, 485 (1963)
93. Persson, I.:
Normal values for plasma fibrin in
the age group 20 - 50 years.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 279 (1955)
94. Petersen, W. E.:
The viscosimetric determination of
blood fibrinogen.
J. Lab. clin. Med. 42, 641 (1953)
95. Pfeiffer-Kossler:
Zbl. Inn. Med. 1 (1896)
zit. in: Starlinger, W.: Über die Methodik
der quantitativen Bestimmung des Fibrinogens.
Biochem. Z. 140, 203 (1923)
96. Pinniger, J. L. und F. T. G. Prunty:
Some observations on the blood clotting
mechanism. The role of fibrinogen and
platelets with reference to a case of
congenital afibrinogenemia.
Brit. J. exp. Path. 27, 200 (1946)

97. Podmore, D. A.:
Rapid turbidimetric methods for the
determination of plasma fibrinogen.
Clin. chim. Acta 4, 242 (1959)
98. Pryce, I. D.:
Simplified microestimation of fibrinogen
and serumucoid in plasma.
Clin. Chem. 13, 650 (1967)
99. Quick, A. J.:
The hemorrhagic disease and the
physiology of hemostasis.
Springfield 1942
100. Rafferty, N. S., A. G. Tyrol jr. und I. A. Parfentjev:
Turbidimetric analysis of fibrinogen and
gamma globulin with ammonium sulfate by
different photometric techniques.
Clin. Chem. 4, 185 (1958)
101. Rappaport, F. und G. Gelger:
Mikromethoden zur Bestimmung von Eiweiß
und seiner Fraktionen im Serum und
Plasma ohne Destillation.
Klin. Wschr. 13, 563 (1934)
102. Rappaport, F. und M. Loew:
A stable standard for the colorimetric
determination of total protein, albumin,
globulin, and fibrinogen.
Clin. chim. Acta 2, 126 (1957)
103. Ratnoff, O. D. und C. A. B. Menzie:
A new method for the determination of
fibrinogen in small samples of plasma.
J. Lab. clin. Med. 37, 316 (1951)
104. Reiner, M. und H. L. Cheung:
A practical method for the determination
of fibrinogen.
Clin. Chem. 5, 414 (1959)
105. Reye:
Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens.
Inaugural Dissertation, Strassburg 1898
zit. in: Starlinger, W.: Über die Methodik
der quantitativen Bestimmung des Fibrinogens.
Biochem. Z. 140, 203 (1923)

106. Richter, W. C.:
Der kjeldahlometrisch bestimmte Normalwert der Fibrinogenfraktion des Blutes in seiner Abhängigkeit vom Lebensalter und Geschlecht.
Z. ges. exp. Med. 128, 418 (1957)
107. Rieche, K.:
Beitrag zum diagnostischen Aussagewert der Fibrinogenbestimmung bei malignen Erkrankungen.
Z. ges. Inn. Med. 19, 662 (1964)
108. Robinson, H. W. und C. G. Hodgen:
The biuret reaction in the determination of serum proteins. II. Measurements made by a Duboscq colorimeter compared with values obtained by the Kjeldahl-procedure.
J. biol. Chem. 135, 727 (1940)
109. Ronchet, J.:
Contribution à l'étude de la prévention des hémorragies opératoires en chirurgie biliaire.
Thèse de Pharmacie, Lyon 1945
110. Rosenberg, A. A.:
Plasma fibrinogen determination a rapid titration method.
Clin. Chem. 2, 331 (1956)
111. Roux, A. Y.:
Die Behandlung der Lymphogranulomatose (M. Hodgkin) mit Vincalcaleukoblastin.
Med. Diss., Mainz 1966
112. Sachs, L.:
Statistische Auswertungsmethoden. 2. Aufl.
Berlin/Heidelberg/New York 1969
113. Salfer, A. und A. Newhouse:
Photometric microdetermination of plasma fibrinogen with a thrombin-Ninhydrin-procedure.
J. biol. Chem. 208, 159 (1954)
114. Sassler, R.:
L'emploi du froid pour retarder la coagulation du sang. Son application au dosage de la fibrine.
Zit. in: Favre-Gilly, J., J. P. Thouverez und J. Belleville: Les techniques courantes de dosage du fibrinogène et de la fibrine.
Nouv. Rev. franc. Hémat. 5, 335 (1965)

115. Scheidegger, J. J.:
Une microméthode de l'Immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)
116. Schneider, C. L.:
Rapid estimation of plasma fibrinogen
concentration and its use as a guide
to therapy of intravascular defibrination.
Amer. J. Obst. Gynec. 64, 141 (1952)
117. Schottke, W.:
Bemerkungen zum Normalwert für Fibrinogen.
Ärztl. Lab. 8, 289 (1962)
118. Schultze, H. E. und G. Schwick:
Quantitative immunologische Bestimmung
von Plasmaproteinen.
Clin. chim. Acta 4, 15 (1959)
119. Schulz, F. H.:
Das Fibrinogen
Leipzig 1953
120. Schulz, F. H.:
Eine einfache volumetrische Fibrinbestimmung.
Ärztl. Lab. 1, 107 (1955)
121. Scott, J. S.:
Blood coagulation failure in obstetrics.
Brit. med. J. 11, 290 (1955)
122. Shinowara, G. Y. und L. J. Rosenfeld:
Enzyme studies on human blood.
VIII. The effect of fibrinogen concen-
tration on the thrombin clotting time.
J. Lab. clin. Med. 37, 303 (1951)
123. Shulman, S.:
The fibrin serum factor.
Nature (London) 171, 606 (1953)
124. Starlinger, W.:
Über die Methodik der quantitativen
Bestimmung des Fibrinogens.
Biochem. Z. 140, 203 (1923)
125. Stenhagen, E.:
Electrophoresis of human blood plasma;
electrophoretic properties of fibrinogen.
Biochem. J. 32, 714 (1938)

126. Stirland, R. M.:
A rapid method of estimating fibrinogen.
Lancet I, 672 (1956)
127. Vermylen, C., R. A. de Vreker und M. Verstraete:
A rapid method for assay of fibrinogen
fibrin polymerization time (FPT Test).
Clin. chim. Acta 8, 418 (1963)
128. Vincent, D., G. Segonzac und R. Lacroix:
Le dosage rapide du fibrinogène.
Ann. Biol. clin. 20, 673 (1962)
129. Ware, A. G., M. M. Guest und W. H. Seegers:
Arch. Biochem. 13, 231 (1947)
zit. In: Henry, R. J.:
Clinical Chemistry; Principles and Technics.
New York 1966
130. Weichselbaum, T. E.:
An accurate and rapid method for the
determination of proteins in small
amounts of blood serum and plasma.
Amer. J. clin. Path. 7, 40 (1946)
131. Winternitz, R.:
Arch. Dermatol. 101, 227 (1910)
zit. In: Starlinger, W.: Über die
Methodik der quantitativen Bestimmung
des Fibrinogens.
Biochem. Z. 140, 203 (1923)
132. Wolfson, W. Q., C. Cohn, E. Calvary und F. Ichiba:
Amer. J. clin. Path., Tech. Sec. 18, 723 (1948)
zit. In: Henry, R. J.:
Clinical Chemistry; Principles and Technics.
New York 1966
133. Wu, H.: A new colorimetric method for the
determination of plasma proteins.
J. biol. Chem. 51, 33 (1922)
134. Wycoff, H. D.:
A microassay for plasma fibrinogen.
J. Lab. clin. Med. 47, 645 (1956)
135. Wycoff, H. D.:
Assay of fibrinogen in small blood samples.
Clin. Chem. 6, 429 (1960)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W.G.A. Ohler für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung und Hilfe.

Herrn Professor Dr. H.P. Wolff danke ich für die Erstattung des Korreferates.

Frau Dr. Dr. Netter vom Institut für Medizinische Dokumentation und Statistik (Direktor: Professor Dr. Dr. Koller) danke ich für die hilfreichen Hinweise.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Landwirtes Hans Görnitz und dessen Ehefrau Erika Görnitz, geb. Buchmann, wurde ich am 3. April 1944 in Thondorf, Mansfelder Gebirgskreis, geboren. Dort verbrachte ich meine Kindheit und wurde 1950 in die Volksschule eingeschult.

Da mein Vater Gutsbesitzer war, sahen wir uns gezwungen, 1952 aus Sachsen-Anhalt zu fliehen. Bedingt durch die Flucht, die uns über West-Berlin zunächst nach Baden-Württemberg und Bayern führte, mußte ich die Volksschule häufig wechseln. Zuletzt ging ich in die Volksschule in Rauenberg, Kreis Tauberbischofsheim, bis zur 5. Klasse und kam dann 1955 in das humanistische Gymnasium nach Wertheim am Main.

Mitte 1955 verlegten meine Eltern den Wohnsitz nach Worms, wo ich am 3. März 1965 am Staatlichen altsprachlichen Gymnasium Worms das Abitur ablegte.

Vom 1. April 1965 bis zum 31. März 1967 stand ich im Sanitätsdienst der Bundeswehr in München und habe während dieser Zeit ein vierteljähriges Krankenpflegepraktikum an der Chirurgischen Universitätsklinik in Freiburg i. Br. absolviert.

Zum Sommersemester 1967 immatrikulierte ich mich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, um das Medizinstudium zu beginnen. An dieser Universität habe ich dann nach zwei Semestern im März 1968 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach fünf Semestern im September 1969 die ärztliche Vorprüfung abgelegt. Das klinische Studium setzte ich ebenfalls in Mainz an der Universitätsklinik fort. Zur Zeit bin ich im sechsten klinischen Semester.

